

50524
44



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**Marcaje Sitios Específicos de Proteínas a través del uso
de Sondas Fluorescentes para Monitorear Cambios
Conformacionales.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO

ASESOR:

Q.F.B. GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ

TESIS CON
FALLA DE CRICEN

MÉXICO D.F. 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

Introducción.....	5
Abreviaturas.....	7
1. Marco teórico.....	9
1.1 Generalidades de las proteínas.....	9
1.2 Las proteínas desde el punto de vista evolutivo.....	10
1.3 Proteínas estructura y dinámica.....	10
1.4 Ingeniería de proteínas.....	11
1.5 Reconocimiento molecular y catálisis.....	12
1.6 La regulación alostérica.....	14
1.7 Modelo de estudio de la transición alostérica; Glucosamina 6- <i>P</i> desaminasa.....	15
1.8 Interacciones intramoleculares en proteínas.....	18
1.9 Espectroscopia de fluorescencia.....	18
1.10 Introducción de sondas fluorescente y paramagnéticas como una técnica alternativa al estudio de la movilidad o flexibilidad en proteínas.....	19
1.11 Introducción de sondas fluorescentes.....	21
2. Planteamiento del problema.....	23
3. Objetivo.....	23
4. Hipótesis.....	24
5. Materiales y métodos.....	25
5.1 Materiales.....	25
5.1.1 Materiales químicos.....	25
5.1.2 Materiales biológicos.....	25
5.1.2.1 Cepa bacteriana.....	25
5.1.2.2 Plasmidos.....	26
5.2 Métodos.....	28
5.2.1 Síntesis de la matriz de afinidad.....	28
5.2.2 Síntesis de GlcNAc6- <i>P</i>	28
5.2.3 Síntesis de GlcNol-6 <i>P</i>	29
5.2.4 Mutaciones.....	30
5.2.5 Transformación.....	31
5.2.6 Expresión de la enzima recombinante en <i>E. coli</i>	31
5.2.7 Purificación de la Glucosamina 6- <i>P</i> desaminasa.....	32
5.2.8 Modificación química.....	33
5.2.9 Determinación de la velocidad enzimática.....	34
5.2.10 Ajuste cinético.....	34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.11 Fluorescencia extrínseca.....	35
6. Resultados y discusión.....	36
6.1 Comportamiento cinético.....	36
6.1.2 Enzima silvestre.....	36
6.1.3 Enzima descisteinizada (silvestroide).....	38
6.1.4 Mutante His164Cys-mbm.....	39
6.2 Propiedades de la sonda fluorescente (monobromobimano).....	41
6.2.1 Espectros de emisión y fluorescencia.....	41
6.2.2 Monobromobimano-Cisteína en diferentes ambientes de polaridad relativa.....	42
6.2.3 Mutante His164Cys-mbm en diferentes ambientes de polaridad relativa.....	44
6.3 Mutante His164Cys-mbm.....	46
6.3.1 Apagamiento de la fluorescencia.....	47
6.3.2 Cinética a diferentes concentraciones de activador.....	48
6.3.3 Titulación con activar en fluorescencia.....	50
6.3.4 Cinética a diferentes concentraciones de inhibidor.....	52
6.3.5 Titulación con inhibidor en fluorescencia.....	53
6.4 Mutante Phe174Cys-mbm.....	55
6.4.1 Apagamiento de la fluorescencia.....	56
6.4.2 Comportamiento cinético.....	57
6.4.3 Titulación con activador en fluorescencia.....	58
6.4.4 Titulación con inhibidor en fluorescencia.....	59
6.5 Mutante Phe174Cys-mbm.....	61
6.5.1 Apagamiento de la fluorescencia.....	62
6.5.2 Comportamiento cinético.....	63
6.5.3 Titulación con activador en fluorescencia.....	64
6.5.4 Titulación con inhibidor en fluorescencia.....	65
7. Conclusiones.....	66
8. Propuestas.....	69
9. Anexos.....	70
9.1 Protocolo de Cinética.....	70
9.2 Tabla de propiedades de solventes orgánicos.....	72
10. Bibliografía.....	73

TESIS CON
 FALLA DE CONTIN

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Ubicado en el 2do piso de la Torre de Investigación, bajo la dirección del Dr. Alejandro Sosa Peinado, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción

Las proteínas son biomoléculas de gran importancia para los procesos bioquímicos, que ocurren en cualquier organismo y como tales desempeñan diversas funciones entre las más importantes están los procesos contráctiles, el transporte a través de membranas, la transducción de señales y la catálisis. En todos estos procesos en los que participan las proteínas, el de catalizar lo llevan a cabo las enzimas, siendo estas las que a la postre reflejan de manera general el funcionamiento general de las células, y como consecuencia de todos los sistemas dentro del organismo. Con lo anterior podemos darnos cuenta de la importancia que representa el estudio de las propiedades de las proteínas y en particular de las enzimas. Las enzimas propiamente son un sistema que se encuentra en equilibrio con sus elementos que las conforman, empezando con los aminoácidos y las interacciones entre estos al estar en un orden o secuencia específica: estas interacciones son de varios tipos como son los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, polaridades relativas, electronegatividades, etc.

Un buen Modelo para estudiar las diferentes propiedades de las proteínas, es la enzima *D*-glucosamina-6-fosfato desaminasa (*GlcN6P* desaminasa), enzima que cataliza la reacción de isomerización y desaminación de la *D*-glucosamina 6-fosfato (*GlcN6P*), para formar fructosa 6-fosfato y amonio, esta enzima es alostérica por lo que cuenta con un activador alostérico *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (*GlcNAc6P*) y con un inhibidor competitivo 2-amino-2-desoxi-*D*-glucitol-6-*P* (*GlcN-ol-6P*) la enzima presenta dos conformeros la forma T (menor afinidad) y la forma R (mayor afinidad). Al llevar a cabo la catálisis la enzima cambia su conformación, estos cambios ocurren en lapsos de tiempo muy cortos con lo que al final solamente contamos con dos estructuras definidas como

conformeros T y R. De estos conformeros se conoce la estructura gracias a la difracción de rayos X de sus cristales, que muestran la transición entre un estado y otro, pero no reflejan los cambios paso a paso. En estas transiciones ocurren una gran cantidad de rearrreglos intramoleculares que están asociados con la misma catálisis enzimática, para interpretar cómo ocurren estos rearrreglos se utilizaron sondas fluorescentes en sitios específicos que proporcionan señales que se pueden correlacionar con cambios conformacionales que ocurren con dos diferentes ligandos (activador e inhibidor). Para el marcaje específico de la enzima con las sondas fluorescentes se utilizan técnicas de mutagénesis dirigida para la inserción de residuos de cisteínas en sitios específicos (Ortiz, 2001), el marcador fluorescente monobromobimano (mbbm) el cual cuenta con características especiales para este fin, como son su alta reactividad a los grupos sulfhidrilo de las cisteínas, una longitud de onda máxima de absorción (λ_{max}) de 486nm, presenta sensibilidad a la polaridad del medio y no interfiere con los fluoróforos naturales de la enzima (triptofanos, tirosinas y fenilalaninas). Gracias a este tipo de sondas se pueden estudiar y correlacionar los aspectos estructurales, funcionales, microambientales y dinámicos de las enzimas de manera integral.

Abreviaturas

ADN Ácido desoxiribonucleico

AUC Ultracentrifugación Analítica

CME Centro de Masa Espectral

dNTPs Desoxiribonucleotidos Trifosfatados

E Absortividad molar

EPR Resonancia Paramagnética del Electrón

FRET Transferencia de Energía por Fluorescencia en Resonancia

Fru6P Fructosa-6-fosfato

GlcN6P D-glucosamina-6-fosfato

GlcN6P desaminasa D-glucosamina-6-fosfato desaminasa

GlcNAc N-acetil-D-glucosamina

GlcNAc6P N-acetil-glucosamina 6-fosfato

GlcN-ol-6P 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-P

His164Cys Enzima Mutada en la posición 164, cambiando la His silvestre por una Cys a partir de la mutante descisteinizada.

His164Cys-mbm Enzima Mutada en la posición 164, cambiando la His silvestre por una Cys y modificada químicamente con el monobromobimano.

ITC Calorimetría de Titulación Isotérmica

K_i Constante de inhibición

k_{cat} Constante catalítica

λ Longitud de Onda (en nm)

mbbm Monobromobimano

mbm Monobimano

mbbm-Cys monobromobimano unido a cisteínas

RMN Resonancia Magnética Nuclear

PCR Reacción en Cadena de Polimerasas

PDB "Protein Data Bank"

Phe174Cys Enzima mutada en la posición 174, cambiando la Phe silvestre por una Cys a partir de la mutante descisteinizada.

Phe174Cys-mbm Enzima mutada en la posición 174, cambiando la Phe silvestre por una Cys y modificada químicamente con el monobromobimano.

Ser171Cys Enzima mutada en la posición 171, cambiando la Ser silvestre por una Cys a partir de la mutante descisteinizada.

Ser171Cys-mbm Enzima Mutada en la posición 171, cambiando la Ser silvestre por una Cys y modificada químicamente con el monobromobimano.

SPR Resonancia de Plasma en Superficie

T_m Temperatura media

WT Enzima Silvestre

1. Marco teórico

1.1 Generalidades de las proteínas

La composición química de las proteínas es relativamente sencilla: son polímeros lineales compuestos por 20 diferentes aminoácidos enlazados a través de uniones peptídicas, cuya secuencia determina su identidad química y en última instancia su función (Goodsell, D. S., 2000). Sin embargo la función de las proteínas, su eficiencia y especificidad de interacción, dependen más directamente de la conformación que adoptan, es decir del arreglo espacio-tiempo de la cadena lineal de aminoácidos, lo que se conoce como estructura terciaria o conformación nativa. Una molécula típica de proteína consta de varios cientos de aminoácidos, por lo que resulta ser un complejísimo sistema con varios miles de átomos. Es sorprendente ya que en las células existen miles de proteínas diferentes y cada una de estas tiene la capacidad de llevar a cabo un trabajo específico, por ejemplo la capacidad de realizar procesos contráctiles, el paso de solutos a través de membranas, el establecer comunicación entre los diferentes componentes celulares y el de catalizar reacciones químicas entre las más importantes. La formación de una proteína funcionalmente competente requiere que la cadena polipeptídica adquiera su estructura nativa para permitir la interacción entre sitios de la cadena; estos sitios pueden estar a distancia de unos cuantos o hasta muchos aminoácidos. Cuando todas las interacciones entre los distintos sitios de la proteína se han establecido se llega al producto final, una molécula con una estructura tridimensional precisa y funcionalmente competente.

En muchas proteínas, la estructura final se forma con una sola cadena de aminoácidos, a este tipo de proteínas se les denomina monoméricas. Sin embargo muchas, en realidad la mayoría de las proteínas existen como oligómeros (Goodsell, 2000). Estas

son el resultado de la interacción de entre dos o más cadenas de aminoácidos, que han adquirido sus respectivas estructuras terciarias. Dentro de las proteínas oligoméricas las más comunes son las diméricas, y dentro de estas las homodiméricas (formadas por dos monómeros idénticos), pero existen proteínas que están formadas por más de 20 monómeros (Goodsell, D. S, 2000).

1.2 Las proteínas desde el punto de vista evolutivo.

La información de los genes se expresa primero, de una manera lineal en la secuencia de las proteínas, de acuerdo con el código genético, pero la función codificada sólo surge de la estructura tridimensional que las proteínas adoptan. Mas aún, incluso la estructura en sí misma no revela directamente la función de la proteína, por lo que el problema verdadero de deducir la función a partir de su secuencia es todavía más complicado. Afortunadamente, por otra parte los genes y sus productos son el resultado del proceso evolutivo, y al igual que los organismos, guardan relaciones perfectamente discernibles que revelan la existencia de sus ancestros comunes, incluso de manera cuantificable. Si contamos con la secuencia de una proteína, de la cual desconocemos su función, el primer paso obligado es la inspección de las bases de datos de secuencia, para detectar alguna otra secuencia con suficiente parecido. Si se encuentra tal secuencia, de inmediato podemos inferir por homología que la función de nuestra proteína está relacionada (incluso cercanamente) con la de la proteína detectada.

1.3 Estructura y dinámica de las proteínas.

La determinación experimental de la posición relativa de la estructura tridimensional de las proteínas, requirió el desarrollo y adaptación de las técnicas de

difracción de rayos X a partir de cristales, estas representaciones estructurales pueden realizarse en unos cuantos meses en la actualidad, constituyendo un logro extraordinario, ya que proporcionan una gran cantidad de información. También se ha incorporado la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) a la gran cantidad de herramientas para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas. Producto de esfuerzo de cristalógrafos y espectroscopistas, se dispone hoy en día de más de 19.000 estructuras cristalográficas reportadas de las cuales 4.000 corresponden a estructuras diferentes disponible es el PDB ("Protein Data Bank"), con las que podemos realizar estudios comparativos y derivar nociones generales sobre la arquitectura de estas biomoléculas. Las imágenes cristalográficas y las obtenidas por RMN proporcionan datos, sobre la colocación de cada uno de los átomos de las proteínas en el espacio tridimensional, y en consecuencia de las distancias que hay entre ellos. Esto permite hacer inferencias razonables sobre las interacciones que mantienen la estructura de las proteínas; y como los ligandos interaccionan con ellas. Sin embargo, las proteínas son sistemas moleculares tan complejos, que todo este conocimiento no es suficiente para predecir, a partir de la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional y sus diferentes funciones.

1.4 Ingeniería de Proteínas

A partir del surgimiento de las técnicas de ADN recombinante, hace cerca de 40 años, se inició una revolución en los enfoques utilizados para estudiar prácticamente todos los fenómenos biológicos, el estudio de las proteínas no fue la excepción. La posibilidad creciente de aislar, caracterizar y especialmente modificar genes, dio origen a formas cada vez más poderosas y sofisticadas de indagar la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas manteniendo una estabilidad. Así mismo, las herramientas y el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conocimiento sobre estos sistemas han potenciado en gran medida, la posibilidad de utilizarlos con fines tecnológicos. Al hablar de ingeniería de proteínas, nos estamos refiriendo a la modificación racional y utilitaria de estas macromoléculas centrales en todos los procesos biológicos. Con gran intuición el químico holandés Mulder fue quien dio nombre a estas sustancias en 1838, utilizando la raíz griega "protos", que significa: primordial o "de la mayor importancia".

La ingeniería de proteínas es una poderosa herramienta de gran utilidad en la actualidad, ya que con técnicas como la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos se permiten realizar multitud de estudios enfocados, al conocimiento básico y aplicado de las proteínas entre los que podemos mencionar el estudio del plegamiento, estructura nativa y estabilidad de péptidos y proteínas, para conocer que implicaciones tienen en la estabilización conformacional de las mismas, el rediseñar centros catalíticos para modificar la especificidad y con ello regular la funcionalidad de una proteína (enzima), el estudio de los mecanismos catalíticos en las enzimas, análisis de homología entre secuencias polipeptídicas, estudios de interacción proteína-ligando para evaluar estructura-función, incrementar la estabilidad o termoestabilidad de las proteínas, y en lo que se refiere al aspecto aplicado la ingeniería de proteínas es utilizada en el diseño de fármacos, determinantes antigénicos, desarrollo de terapias genéticas e inmunotóxicas. Como se puede visualizar esta herramienta es de gran importancia en el ámbito científico para el constante avance tecnológico de este (Jan B van Beilen, 2002).

1.5 Reconocimiento Molecular y Catálisis.

Las estructuras nativas de las proteínas determinan, que la cadena polipeptídica presente arreglos de residuos de aminoácido en posiciones definidas en el espacio

tridimensional, más aún determinadas regiones de la superficie de una proteína que pueden contener densidades de carga electrostática, influenciadas por la estructura completa de la proteína (por ejemplo, los macro dipolos presentes en las α hélices). Asimismo la red de interacciones entre los diversos elementos de estructura determinan una mayor o menor flexibilidad, en algunos segmentos específicos de la cadena polipeptídica. La superficie de una proteína globular, con sus hendiduras y movimientos locales, constituye un tapiz en el que la naturaleza puede dibujar innumerables patrones. Estos patrones específicos de entidades hidrófobas o con carga electrostática, donadoras o receptoras de puentes de hidrógeno permiten establecer una complementariedad en forma y propiedad, con moléculas grandes y pequeñas, es decir determinan la capacidad de reconocimiento molecular.

La mayoría de las reacciones que ocurren en los sistemas vivos son catalizadas por proteínas, conocidas con el nombre de enzimas. Estas enzimas tienen una particularidad muy notable relacionada con el reconocimiento molecular antes mencionado, la cual es que no toda la molécula de proteína presenta actividad catalítica, sino únicamente una región relativamente pequeña de cadenas laterales de aminoácidos, la cual se denomina sitio activo. Los mecanismos de reacción de las enzimas son muy complejos, implicando un número de etapas elementales cada una de las cuales, pueden incluir interacciones complejas entre varios grupos de las moléculas de la enzima y el sustrato, sin embargo estas enzimas no sufren modificaciones químicas irreversibles durante la catálisis. En las reacciones catalizadas por enzimas las velocidades de reacción, así como los mecanismos se ven afectados por cambios en la concentración, el pH y la temperatura. La eficiencia catalítica de las enzimas es cuantificable por la actividad enzimática, la cual es representada

en términos de la velocidad a la que cursa la reacción, y expresada en la k_{cat} definida como el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por sitio activo de enzima y unidad de tiempo, en condiciones de saturación de sustrato.

Con los constantes avances en la comprensión, tanto por determinaciones experimentales como por simulación, de las interacciones moleculares se augura una creciente capacidad para utilizar la información estructural de proteínas, para comprender también las interacciones con otras sustancias y como elemento clave para el diseño de fármacos con base en una molécula blanco.

1.6 La regulación alostérica

Los cambios funcionales que son la base estructural de la regulación alostérica se deben a la existencia de conforméromos con propiedades ligantes o catalíticas diferentes; y que están en equilibrio entre sí. Las enzimas alostéricas controlan muchos procesos mediados por proteínas que son esenciales para la función celular (Perutz 1990). Ellas juegan un papel importante en diferentes procesos, tales como la regulación metabólica, la respuesta de receptores, la expresión de genes, el plegamiento de proteínas asistido por chaperonas y la comunicación intercelular. La regulación de las propiedades de unión de una proteína alostérica puede ser descrita como un equilibrio entre dos diferentes estados conformacionales, uno con baja o nula afinidad por el sustrato definido como estado T y otro con alta afinidad por el sustrato llamado estado R. La transición de un conforméromo a otro involucra cambios estructurales a nivel cuaternario, lo cual promueve modificaciones locales en la estructura terciaria de los monómeros, dando como resultado que se alteren las propiedades de unión del ligando.

La transición alostérica implica la comunicación entre regiones distantes en la molécula de la enzima, lo que requiere la transmisión de señales conformacionales dentro de cada subunidad y entre las subunidades adyacentes.

1.7 Modelo de estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa.

La GlcN6P desaminasa es la enzima que se utilizó como modelo para el marcaje con sondas fluorescentes, ya que cuenta con propiedades y requisitos como son las estructuras cristalográficas de los dos conformeros, poseer ligandos diferentes. La GlcN6P desaminasa cataliza la isomerización y desaminación de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) para formar fructosa 6-fosfato (Fru6P) y amonio. La enzima en su forma activa es un hexámero que presenta 266 aminoácidos por monómero con un peso molecular 29.7 kDa. La actividad de la enzima esta regulada por la unión del activador alostérico N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P).

La GlcN6P desaminasa es una enzima alostérica clásica, que presenta cooperatividad homotrópica positiva con respecto al sustrato GlcN6P, y es activada por la GlcNAc6P, con disminución de la cooperatividad.

El activador alostérico tiene el efecto de aumentar la afinidad aparente de la enzima por la GlcN6P (o la Fru6P en el sentido inverso), lo que se acompaña de la pérdida de la cooperatividad homotrópica. A concentraciones saturantes de activador, la enzima presenta una cinética hiperbólica.

La estructura cristalográfica de la enzima ha sido resuelta a nivel atómico para la forma T y la R, presentan un arreglo de hexámero (seis monómeros idénticos) definidos como un dímero de trímeros con un eje de simetría de orden tres y tres ejes de orden dos, perpendiculares al eje de orden tres, que además cruzan el centro de la molécula. La

estructura presenta un dominio α/β abierto con siete cadenas paralelas tipo β en la cavidad central, rodeado por ocho hélices tipo α , además presenta tres cadenas β en forma antiparalela, entre dos de estas cadenas β plegadas se encuentra un hélice α (figura 1).

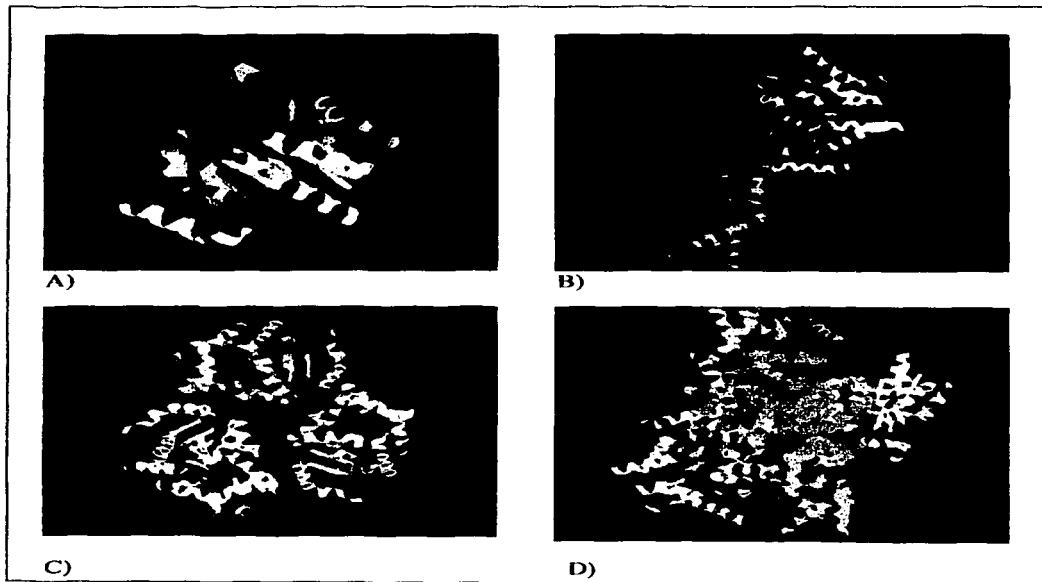


Figura 1. Estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa a partir del archivo PDB 1CD5. A) estructura monomérica, B) estructura dimerica, C) estructura trimerica y D) estructura Hexamérica.

El mecanismo químico de la reacción catalizada por la GlcN6P desaminasa fue descrito inicialmente por Midelfort y Rose (1977), analizado en términos estructurales por Oliva y col. (1995), por Montero-Morán y col. (2001), por mutagénesis dirigida y

modificaciones químicas. El siguiente esquema muestra la visión actual del mecanismo de la enzima (figura. 2).

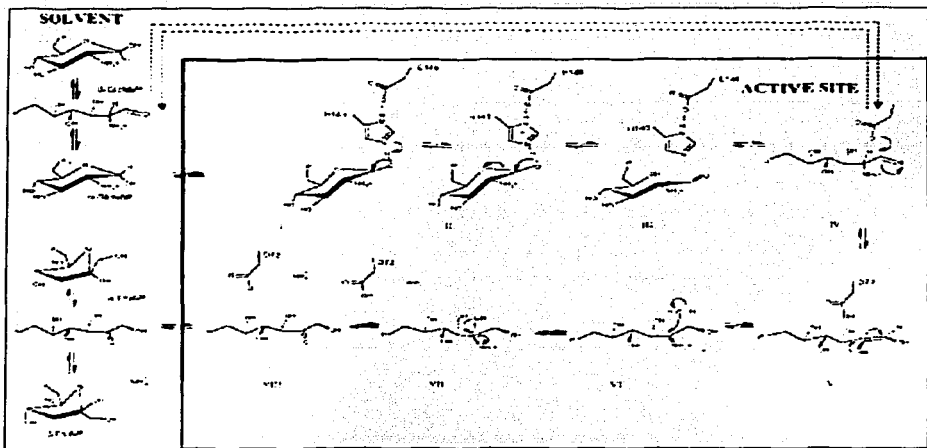


Figura 2. Mecanismo de acción de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

El mecanismo de acción de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. tiene los siguientes pasos I. Apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P, la cual queda unida a la enzima por su grupo amonio. II. El carboxilato del Asp72 sustrae un protón del C2. III. A la vez que ocurre el paso II se lleva a cabo la enolización entre C1 y C2 del aminoazúcar (formación de un *cis*-enol-amonio). IV. El protón del residuo 72 se transfiere al átomo de oxígeno del carbonilo en el C1. V. Una molécula de agua reacciona con el enlace π (C1=C2) del intermediario *cis*-enolamónio. VI. La carbinolamina formada en el paso anterior pierde el protón del átomo de oxígeno en C2 (hacia el carboxilato de D72).VII. El intermediario es sumamente inestable y mediante un mecanismo concertado, el alcóxido formado oxida a C2 para formar un carbonilo cetónico y liberar amoníaco.

1.8 Interacciones intramoleculares en proteínas

Las superficies de las proteínas juegan un papel clave en su función biológica, consecuentemente la estructura de la superficie de las proteínas es la base para predecir la función a partir de la estructura de las mismas. Uno de los principios observados en las interacciones proteicas es que muchos ligandos deben competir con el agua y pequeñas moléculas en la superficie de las proteínas, los cuales además deben complementar las interacciones a este nivel, para lo cual existen una gran variedad de técnicas experimentales y Modelos computacionales, para obtener una idea de que interacciones intramoleculares pueden presentarse en las superficies de las proteínas relacionando la energética estructural de estas interacciones las cuales pueden cambiar dependiendo de las moléculas a enlazar (Hubell, W.L. 2000).

La caracterización de las interacciones proteína-proteína o proteína-ligando se puede llevar a cabo experimentalmente, siempre y cuando sea posible tener tanto la proteína como el ligando puros y estables por medio de diferentes técnicas como por ejemplo NMR (Nuclear Magnetic Resonance), SPR (surface plasmon resonance), AUC (Analytical ultracentrifugation) acoplado a un detector óptico, ITC (Isothermal Titration Calorimetry) y fluorescencia (intensidad o anisotropía), (Blow, D.M. 1992).

1.9 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia se fundamenta en que una molécula excitada electrónicamente puede perder su energía de excitación y volver al estado inicial de varias maneras como las transiciones radiativas y no radiativas. En este caso nos referiremos exclusivamente a las radiativas, que son las que corresponden al fenómeno de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fluorescencia. Dicho en otras palabras la energía de los fotones absorbidos son emitidos como fluorescencia cuando se produce una transición radiativa (Lakowicz , J. R. 1999).

La fluorescencia en proteínas tiene una gran sensibilidad puesto que el límite de cuantificación, se encuentra alrededor de magnitudes de nanomolar e inclusive de picomolar dependiendo de la interacción a cuantificar, y del grado de afinidad que se tenga ya sea proteína-proteína o proteína-ligando (Bergström, F. 1999 y Steven E. Mansoor 2002).

El tiempo de resolución de la fluorescencia de los triptofanos de las proteínas pueden separar la forma global, a partir de los movimientos locales y proveer información sobre de la estequiometría de los complejos a concentraciones micromolares que pueden ser utilizados para analizar curvas de titulación a bajas concentraciones. Una ventaja adicional de la técnica de fluorescencia es que pueden ser complementarias a los experimentos cinéticos así como el estudio de las interacciones *in situ* e *in vivo* (Edward M. Kosower 1986).

1.10 Introducción de sondas fluorescentes y paramagnéticas como una técnica alternativa al estudio de la movilidad o flexibilidad en proteínas.

La fluorescencia es ideal para estudios relacionando la estructura y la función de proteínas, debido a los cambios de los parámetros espectrales de los fluoróforos de acuerdo con la accesibilidad al solvente, cambios en la polaridad de medio, o su movilidad (Lakowicz, 1999). Sin embargo, no siempre se encuentra el fluoróforo en la región de interés (triptofano), este problema ha sido resuelto por el uso de técnicas de mutagénesis dirigida combinada con la modificación química, (introducción de sondas por marcajes específicos) Bergström, F. 1999. La ventaja es que ambas técnicas se encuentran bastante



difundidas y los costos son bajos con respecto a la cristalografía y la RMN, otra ventaja con las sondas fluorescentes es la selección de fluoróforos con tiempo de vida mayores al grupo indol de los triptofanos (requerido en estudios de anisotropía), o en la selección de las propiedades espectroscópicas del fluoróforo para que no interfieran o se oculten sus señales por la fluorescencia intrínseca de la proteína. Esto permite realizar un diseño más racional de las propiedades estructurales a estudiar y ahorrar trabajo en construir mutantes en sitios específicos que eliminan residuos aromáticos; debido al riesgo adicional de cambios en las propiedades catalíticas de la enzima a estudiar. Otra ventaja es el aprovechamiento de la técnica de transferencia de energía entre fluoróforos que permite medir distancias moleculares entre dominios de una proteína (Selvin, P.R., 2000).

Estudios recientes sobre la determinación de los parámetros de λ máxima de emisión y anisotropía, en estado estacionario de fluoróforos incorporados (de manera selectiva) a residuos específicos de la lisozima T4, correlacionan con el área de superficie accesible al solvente. El análisis de la correlación entre la periodicidad de los parámetros señalados permitió evidenciar la estructura secundaria de la lisozima T4, que concuerdan con la estructura cristalográfica (Mansoor, 1999).

De manera similar ha sido desarrollada la técnica de introducción de sondas paramagnéticas a través de modificación química de residuos de cisteína, creados por mutagénesis dirigida. Este tipo de estudios ha permitido determinar la distancia entre dos residuos (~ 20 Å), los patrones de movimiento entre dominios de una proteína o generar la topología de proteínas de membrana (Hubell, 2000). El resultado más espectacular fue la generación de la estructura tridimensional de una proteína integral de membrana, el canal de potasio concordando con la estructura obtenida por la técnica de difracción de rayos X,

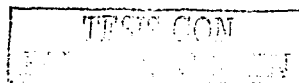
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

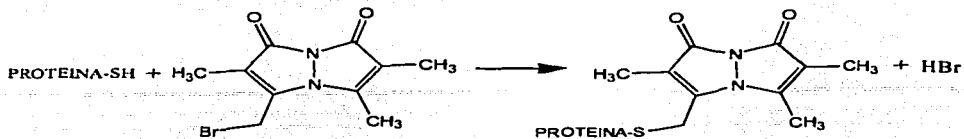
esta técnica permitió medir distancias moleculares de la boca del canal de potasio durante la apertura y cierre en solución (Linda Columbus. 2002).

1.11 Introducción de sondas fluorescentes.

Los métodos de marcaje de proteínas en sitios específicos ayudan a estudiar la estructura y la dinámica de las proteínas, este método está basado en la introducción de residuos de cisteínas en regiones definidas de una proteína a los cuales se les unen los sensores fluorescentes con los que se obtiene información local, determinando cambios conformacionales en las proteínas e infiriendo propiedades de las mismas (Hubell, W.L. 2000).

Recientemente se han sintetizado comercialmente diferentes sondas fluorescentes unidas a derivados del grupo tiolsulfonato (Toronto Research Chemical Inc., Canada). A la fecha existen tan sólo en el catálogo de esta compañía, 15 sondas diferentes con derivados de los grupos dansilo, cumarina, rodamina etc. La compañía Molecular Probes, USA, cuenta con la sonda fluorescente monobromobimano (mbbm) que es pequeña y se han caracterizado las propiedades espectrales (Mansoor, 1999 y Edward M. Kosower 1986). Esto permite contar con una serie de variables en cuanto a la señal de fluorescencia, o inclusive determinar distancias moleculares (Bergström, 1999 y V. Ratner. 2002). Estos derivados presentan un grupo tiolsulfonato en su estructura por lo que son específicos y altamente reactivos a los grupos sulfihídrido de las cisteínas con respecto a los demás grupos funcionales de los aminoácidos. Por lo que la introducción de un residuo de cisteína con técnicas de genética molecular o bien usando las cisteínas presentes en la proteína se pueden introducir sondas de manera selectiva, este proceso se esquematiza a continuación:





Si el grupo SH está expuesto al disolvente, es altamente reactivo con la sonda fluorescente mbbm, el cual termina unido covalentemente a la enzima.

2. Planteamiento del problema

Desarrollar un método de marcaje en sitios específicos con sondas fluorescentes posicionadas en la enzima Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*, para el estudio de los cambios conformacionales inducidos por la unión de sus ligandos en solución. Los conformeros T y R de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, se han obtenido a partir de estructuras cristalográficas; de manera que los conformeros de la enzima se encuentra en un estado estático, ya que las interacciones dinámicas que ocurren de manera normal son alteradas, por lo tanto se pretende desarrollar un método de marcaje en diferentes sitios específicos con la introducción de sondas fluorescentes posicionadas en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, de manera específica; para el estudio de cómo se llevan a cabo los cambios conformacionales inducidos por la unión de ligandos (activador e inhibidor) en solución, y con ello poder inferir propiedades de esta enzima relacionando su estructura, su dinámica y su función.

3. Objetivo

El objetivo general es desarrollar un método de marcaje en sitios específico de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*, con la combinación de técnicas de mutación dirigida y modificación química.

Planteando los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar mutaciones en zonas específicas de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*.
2. Caracterizar las mutantes cinéticamente.

3. Modificar y caracterizar las mutantes marcadas químicamente con el fluoróforo mbbm.
4. Determinar fluorométricamente los cambios conformacionales, con los ligandos (activador e inhibidor competitivo).

4. Hipótesis

Al marcar la enzima Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*. en sitios específicos con el fluoróforo y al interaccionar con los diferentes ligandos en un ambiente dinámico, se podrá relacionar y detallar estructuralmente la propagación de los cambios conformacionales inducidos por la unión de los ligandos.

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Materiales químicos

La mayoría de las sustancias químicas fueron contenidas a partir de Sigma-Aldrich S.A de C.V., México. El activador alostérico GlcNAc6P, fue preparado por acetilación de la GlcN6P con anhídrido acético y se purificó por cromatografía de intercambio iónico como lo describe Rogers y col. 1988.

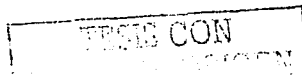
El inhibidor competitivo 2-amino-2-desoxi-D-glucitol 6-fosfato (GlcN-ol-6P), fue sintetizado por reducción de GlcN6P con borohidruro de sodio y se purificó por cromatografía de intercambio iónico (Dowex 50) de acuerdo a los trabajos de Rogers y col. 1988.

El modificador químico fluorescente, monobromobimano fue obtenido de la compañía Toronto Chemical Research Inc. (Toronto, Canada).

5.1.2 Materiales biológicos

5.1.2.1 Cepa bacteriana

La cepa de la bacteria *Escherichia coli*, empleada para la expresión de proteína fue IBPC590 la cual amablemente fue obsequiada por la Dra. Jacqueline Plumbridge del Instituto de Biología Físicoquímica de Paris, Francia. Esta cepa fue derivada de la JM101, en donde se eliminó el gene *nagB* (gene de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa) por inserción de un casete de resistencia a la kanamicina (Myriam M. Altamirando, 1991). Otra característica importante es que esta cepa presenta un genotipo Δlac (gene lac, genera la



proteína inhibidora que se une a la región promotora) por lo que la expresión de la proteína es constitutiva.

Para los ensayos de mutagénesis dirigida, transformación bacteriana y purificación de ADN, así como la secuenciación del ADN se utilizaron las cepas de *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, California, USA) y JM101 respectivamente.

5.1.2.2 Plásmidos

Se utilizó el vector pTZ18R en donde se insertó un fragmento de ADN que contiene una copia del gen *nag B* (descrito en el inciso anterior). El fragmento se subclonó por digestión con EcoR I y HindI III a partir del plásmido descrito por Altamirano y col 1991. Con este plásmido se llevó a cabo la mutagénesis sitio específico, por PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el método comercial de "QuickChange" de la compañía Stratagene (California, USA). En este método se utilizó un par de oligonucleótidos mutagénicos para sintetizar copias del vector de expresión (conteniendo la mutante), y se utilizó la cepa de *E. coli* XL1- Blue para transformar el ADN mutagénico obtenido por PCR. Previo a la transformación se digirió el producto de PCR con la enzima DpnI que reconoce ADN metilado.

A partir del gene silvestre se eliminaron tres posiciones correspondientes a cisteínas que fueron remplazadas por serinas (cys118ser, cys228ser y cys239ser), esta triple mutante conserva las características cinéticas de la enzima silvestre. La creación de la triple mutante se llevó a cabo de manera secuencial; los oligonucleótidos mutagénicos fueron:

FC118S¹
5'-GAC GCC GAG AGC CGC CAG TAT-3' TM²=70.1
RC118S¹
5'-ATA CTG GCG GCT CTC GGC GTC-3' TM =70.1

Para crear la mutante: cys118ser.

A partir de esta mutante se creo la doble mutante cys118ser, cys228ser con el oligonucleótido:

F_C228S
5'-ACC ATC AGC AGT CTG CAA CTG C-3' TM 65
R_C228SR
5'-G CAG TTG CAG ACT GCT GAT GGT-3' TM 65

Finalmente se creo la triple mutante cys118ser, cys228ser, cys239ser.

F_C239S
5'-ATC ATG GTG AGC GAT GAA CCT TC-3' TM 64.5
R_C239S
5'-GA AGG TTC ATC GCT CAC CAT GAT-3' TM 64.5

La triple mutante fue el punto de partida para introducir posiciones específicas con nuevas cisteínas, que fueron las siguientes tres mutaciones independientes.

cys118ser, cys228ser, cys239ser, his164cys

FH164C
5'-TAT CAA AAC CCT GAC TTG CGA CAC TC-3' TM = 66.6
RH164C
5'-AGT GTC GCA AGT CAG GGT TTT GAT AC-3' TM = 65.7

cys118ser, cys228ser, cys239ser, ser171cys

FS171C
5'-GCA AAC TGC CGT TTC TTT GAT AAC G-3' TM = 63.1
RS171C
5'-TAT CAA AGA AAC GGC AGT TTG CGA C-3' TM = 66.8

¹ F denota el oligo en dirección 5'-3' y el R denota el oligo en 3'-5' con respecto al marco de lectura

² Temperatura media

cys118ser, cys228ser, cys239ser, phe174cys
F174CF
5'-AAC TCT CGT TTC TGT GAT AAC GAT G-3' TM 61.3
F174CR
5'-CGT TAT CAC AGA AAC GAG GTT TGC-3' TM 62.94

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 Métodos

5.2.1 Síntesis de la matriz de afinidad

La matriz de afinidad de *N*-6-amino-*n*-hexanoil-D-glucosamina-6-fosfato agarosa se preparó por la unión de GlcN6P con agarosa-ácido 6-amino-*n*-hexanoico (2 µeq de grupos amino hexanoato por ml gel). A la suspensión de agarosa en agua, se le agregó GlcN6P (forma ácida) con una concentración final de 0.1 M y el pH fue ajustado a 4.5 con NaOH. La reacción se realizó a temperatura ambiente adicionando 0.2 mM de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidroclicorada por cada mL de suspensión, agitando suavemente por 12 horas. El gel fue lavado con amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.25 y NaCl 0.1 M.

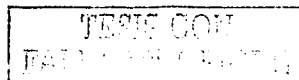
5.2.2 Síntesis de GlcNAc6P

La *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P) se sintetizó a partir de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) sal de sodio, se pesaron 2 gramos de esta y se resuspendió en 18 mL de agua, se le adicionaron 400mg de bicarbonato de sodio (NaH₂CO₃) manteniendo la reacción en frío, agitada y a un pH entre 6 y 7, posteriormente se le adicionaron 640µL de anhídrido acético (CH₃OCOCOCH₃), controlando el pH entre 6 y 7 con hidróxido de potasio 1N (KOH) hasta estabilizarlo, se dejó reaccionar durante 12 horas aproximadamente, después se acidificó y se pasó por la columna Dowex 50WX4-200 la

cual se eluyó con agua, la elución se siguió colorimétricamente con el siguiente procedimiento: se colocaron 100 μ L de una solución de borato de potasio (realizada a partir de ácido bórico e hidróxido de potasio) y 2.5 μ L de las fracciones recolectadas se calentaron a punto de ebullición por 3 minutos, se dejaron enfriar y se les agregó 1 mL de una solución que contiene 1% p/v paradimetilamino benzaldehído, 1% v/v de ácido clorhídrico 12 M en ácido acético, se agitó y se incubó a 37°C por 15 minutos, los tubos positivos que contienen la GlcNAc6P desarrollan un color morado el cual es medido a 544nm, posteriormente se eliminó el exceso de ácido acético con ayuda de una liofilizadora y se resuspendió con agua en una cantidad proporcional al volumen obtenido, se neutralizó con hidróxido de potasio 10 N a un pH de 7.7 y por último se liofilizó.

5.2.3 Síntesis de GlcN-ol-6P

El 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-P (GlcN-ol-6P) fue sintetizado a partir de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) sal de sodio y borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor. Se disolvieron 250mg de D-glucosamina-6-fosfato en 10 mL de agua y se le agregaron 75 mg de borohidruro de sodio de forma lenta durante 2 horas manteniendo la reacción en frío, agitando y en un rango de pH 8-9 (con ácido acético 1 N), manteniéndose durante aproximadamente 15 horas a temperatura ambiente o en frío, se ajustó el pH a 3 con ácido acético 6 N y con ácido clorhídrico 10 N al final, después de que se ajustó se pasó por una columna de Dowex 50 eluyendo con agua, la elución es seguida por actividad enzimática, las fracciones que contienen el GlcN-ol-6P son neutralizadas con NaOH 19N hasta un pH final de 7.5 y por último se liofilizó con una liofilizadora y centrifuga de vacío del tipo Speed Vac, Savant SC10.



5.2.4 Mutaciones

La mutagénesis se realizó utilizando la enzima Pfu polimerasa, se adicionó los desoxiribonucleotidos trifosfatados (dNTPs) más $MgCl_2$ de acuerdo al protocolo proporcionado por la compañía Stratagene. Una vez generado el ADN mutagénico, se digirió el plasmido original (no mutagénico) en presencia de la enzima de restricción DpnI que reconoce al ADN metilado proveniente de la bacteria.

El programa del termociclador usado se describe a continuación:

Proceso	Temp(°C) / tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 / 1.5 min	1
Desnaturalización	95 / 1 min	25*
Hibridación	50 / 1 min	25*
Polimerización	68 / 10 min	25*
Extensión final	68 / 10 min	1

* Estos ciclos son realizados de manera consecutiva.

Se utilizó el *kit* Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA. E.U.A). Se transformó el producto PCR en células competentes epicurian XL1- blue de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente los plásmidos resultantes se secuenciaron para verificar la mutación.

5.2.5 Transformación

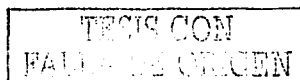
El vector que lleva la enzima mutante se utilizó para la transformación de una cepa de *E. coli* IBPC590 por electroporación, utilizando el electroporador *gene pulser II* (BIORAD). La muestra se sometió a un pulso eléctrico de 2.5 KV, con una capacitancia de 25 μ F y una resistencia 200 W. Estas condiciones generan un campo eléctrico de 12.5 KVcm⁻¹ que duran aproximadamente 4 microsegundos. Para permitir la expresión del gen de resistencia se incubó durante 1 hora a 37°C, y posteriormente se sembró en placas de agar que contienen ampicilina a una concentración final de 50 μ g mL⁻¹.

Este producto de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli*, Epicurian Coli XL2-Bluc. De éstas se seleccionaron 3 colonias y sus plásmidos fueron purificados por la técnica de mini columnas de intercambio iónico de la compañía Quiagen (California, USA), y el gen *nagB* se secuenció para verificación, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular con un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer, confirmando así la mutación.

5.2.6 Expresión de la enzima recombinante en *E. coli*

Se inoculan tubos de 10 mL de medio Luria-Bertani (LB)³ conteniendo ampicilina (50 μ g mL⁻¹), y se incubó a 37°C en una agitadora orbital a 200 rpm durante 12 horas. Posteriormente se utilizó este cultivo para inocular matraces Erlen-Meyer con 200 mL del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones durante 4 horas. Este cultivo se utilizó

³ Este medio contiene triptona 10g/L, NaCl 10g/l y extracto de levadura 5g/L. se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 0.1N y HCl 0.1N.



para inocular matraces Erlen-Meyer de 2 L conteniendo 1 L del mismo medio y se cultivó a 30°C durante 8 horas a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica a 550 nm mayor a 1.

5.2.7 Purificación de la Glucosamina 6- fosfato desaminasa

Las células se centrifugaron a 25,000g durante 10 minutos a 4°C y se lavaron con 250 mL de KCl 0.15M en frío y se centrifugaron en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante. El precipitado celular se lavó y resuspendió en un amortiguador Tris 50 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM a 4°C, las células se rompieron por sonicación a 4 °C, utilizando un sonicador (Ultrasonic Homogenizer) con pulsos de 20 segundos con una amplitud de 40 % a intervalos de descanso de 2.5 minutos (para evitar calentamiento que podría implicar desnaturalización de proteínas). La muestra se centrifugó a 27,000 x g (4°C) durante 45 minutos para eliminar restos celulares en una centrifuga Beckman Avanti J-25I rotor Beckman JA 25.50. El sobrenadante se le agregó sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) hasta obtener una solución saturada del 40 % (p/v); nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones anteriores excepto que fue durante 30 minutos, se eliminó el precipitado que no contiene la enzima de interés. Posteriormente se saturó el sobrenadante al 55% para precipitar la proteína de interés (la Glucosamina-6-*P* desaminasa), la cual se centrifugó bajo las mismas condiciones.

El siguiente paso de purificación se llevó a cabo a través de un método de cromatografía de afinidad, es decir se hace pasar la proteína por una columna cromatografía la cual contiene un material (agarosa-ácido 6-amino-*n*-hexanoico) que tiene unidas moléculas de GlcN6P (D-glucosamina-6-fosfato) por el grupo amino, de manera que se asemejan al activador alostérico (GlcNAc6P ligando de la enzima) y esto hace que la

GlcN6P desaminasa se una al ligando inmovilizándola de manera específica. La columna es lavada de proteínas que no interactúan con el ligando (con el amortiguador Tris 50mM pH 7.5). La GlcN6P desaminasa es eluida, separándola de la matriz por la adición del activador alostérico (GlcNAc6P) a una concentración de 10mM, las fracciones que muestran actividad fueron colectadas y dializadas con un buffer de Tris 50 mM (pH 7.5), durante 12 horas y se conservo a 4°C por una semana, o bien se conserva en 50% de glicerol (v/v) a -20°C por un mayor tiempo.

Se determino la concentración de la enzima a partir de su absorción molar que es de $\epsilon_{280} = 202000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Calcagno, 1984), utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Cary 400 Varian, Australia.

5.2.8 Modificación química

La modificación química de las mutantes se realizó utilizando un exceso molar de 10X de el mbbm (marcador fluorescente), a partir de una solución madre preparada en acetonitrilo (concentración entre 50-200mM), la modificación se llevo a cabo colocando la cantidad correspondiente del mbbm a la proteína que se encuentra en amortiguador Tris HCl 50 mM a pH 7.5 y manteniendo a 4°C durante 12 horas protegida de la luz. Posteriormente se eliminó el exceso de mbbm que no reaccionó, con lavados utilizando tubos Amicon® Ultra-4 PL-10, con un corte de peso molecular de 10,000 Da de la compañía MILLIPORE; y se obtuvo la eficiencia de la modificación determinado la concentración del mbbm a partir de su absortividad molar de $\epsilon_{380} = 5000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Steven E. Mansoor, 2002).

5.2.9 Determinación de la velocidad enzimática

La determinación de actividad en velocidades iniciales de la enzima se realizó en la dirección de la formación de Fru6P en una mezcla de reacción de 200 μ l que contiene amortiguador Tris HCl pH 7.7 100 mM, EDTA 25 mM, con concentraciones variables de activador y de sustrato. La reacción se inició por la adición de la enzima y la mezcla se incubó a 30°C. La reacción se interrumpió a los 10 minutos mediante la adición de 2 mL de HCl 10 M. La concentración de fructosa se determinó adicionando 0.5mL de resorcinol e incubando por 10 minutos a 70° C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se tomaron las lecturas correspondientes a 512nm comparadas con una curva patrón de Fru6P; método de resorcinol (Midelfort, 1976), ver protocolo en el anexo.

5.2.10 Ajuste cinético

Fueron analizados por regresión no lineal utilizando el programa Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). Ajustando los datos con las ecuaciones de Michaelis-Menten y Hill.

Función de Michaelis-Menten

$$v = I_{\text{max}} \frac{A}{K + A} \quad \text{Ecuación 1}$$

Función de Hill

$$v = I_{\text{max}} \frac{A^n}{K^n + A^n} \quad \text{Ecuación 2}$$

TRABAJOS CON
EVALUACIÓN CONTINUA

La ecuación 1 corresponde a una función hiperbólica rectangular, la cual describe el proceso de unión del sustrato a la enzima, mas la constante de velocidad de formación del producto, la ecuación 1 es similar a la ecuación de Hill solamente varía la eliminación del parámetro n (h).

5.2.11 Fluorescencia Extrínseca

Las mediciones de fluorescencia extrínseca se realizaron en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL). La temperatura de las celdas se mantuvo a $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, la longitud de onda (λ) de la luz de excitación fue de 381 nm (ancho de banda de 4nm) y se colectó la emisión de luz de 400 a 600nm (ancho de banda de 8nm), utilizando celdas de cuarzo de 0.4 cm de paso de luz con un volumen máximo de 0.560 mL tipo 3-4.45 con adaptador FCA4 (Starna Atascadero, CA "ver anexo"). Las concentraciones finales de las mutantes marcadas (un fluoróforo por cada monómero) fueron de 1 a 6.26 μM en un volumen final de 500 μL , las concentraciones finales de los ligandos fueron de 100 mM para el activador (GlcNAc6P), 100 mM para el inhibidor (GlcN-ol-6P) y de 1.27 M para el ioduro de potasio (KI). Se realizaron titulaciones con los diferentes ligandos para cada mutante, el volumen máximo fue de 510 μl en todos los casos. El centro de masa espectral (CME) se calculó de los datos de intensidad (I_{λ}) obtenidos a diferentes longitudes de onda (λ), usando la siguiente ecuación: $\text{CME} = \frac{\sum \lambda I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$.

Los datos fueron procesados con el programa Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA) a partir de archivos en formato tipo ASCII obtenidos directamente del espectrofluorómetro.

6. Resultados y Discusión

6.1 Comportamiento cinético

6.1.2 Enzima silvestre

La enzima GlcN6-P desaminasa presenta efectos cooperativos (ver marco teórico) que se observan en la forma de la velocidad de reacción, al adicionar diferentes concentraciones de sustrato se observa la forma sigmoidea que indica cooperatividad, sin embargo al adicionar el activador (1mM) la gráfica de velocidad a diferentes concentraciones de sustrato presenta una forma hiperbólica rectangular (figura 3).

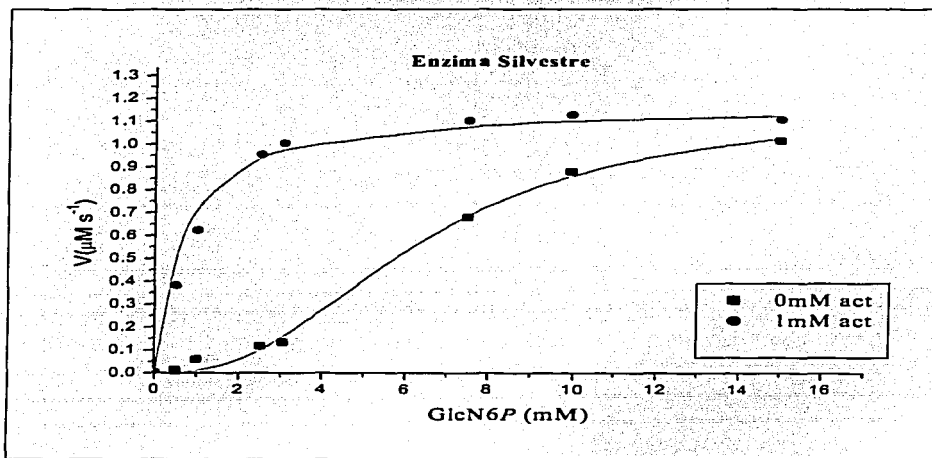


Figura 3. Comportamiento cinético de la GlcN6-P desaminasa silvestre.

Condición: 0mM activador

Modelo: Hill

V_{max}

$K_{0.5}$

h

$0.785 \mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 130.93 s^{-1}
 3.614 mM
 2.473

Condición: 1mM activador

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max}

K_M

$0.821 \mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 136.83 s^{-1}
 1.356 mM

La forma silvestre de la enzima presenta un comportamiento homotrópico positivo con respecto al sustrato en ausencia del activador (Figura 3), a su vez se presenta un comportamiento heterotrópico positivo con respecto al activador (comportamiento hiperbólico). La determinación de la actividad se realizó en condiciones de velocidades iniciales en donde no más del 10% del sustrato se transformó en producto. La interpretación de este efecto cooperativo se debe a que la enzima presenta dos conformeros T (baja afinidad por el sustrato) y R (alta afinidad por el sustrato). La adición de concentraciones crecientes del sustrato lleva a la forma R, lo que quiere decir que existe una afinidad diferencial al sustrato entre los dos conformeros y dependiendo de la fracción de la población entre T y R se observa el comportamiento sigmoidal de actividad en ausencia del activador. En cambio cuando se adiciona el ligando heterotrópico (ligando del sitio alostérico) la enzima pasa a su conformero R y por eso presenta un comportamiento hiperbólico ajustable a una ecuación de Michaelis-Menten, en cambio en ausencia del activador los datos se ajustan a la ecuación de Hill donde el parámetro adicional es h (número de Hill), que describe el grado de cooperatividad de la enzima, en este caso tiene un h de 2.4 el cual se tomará como base para comparaciones posteriores con respecto a la cooperatividad.

6.1.3 Enzima descisteinizada

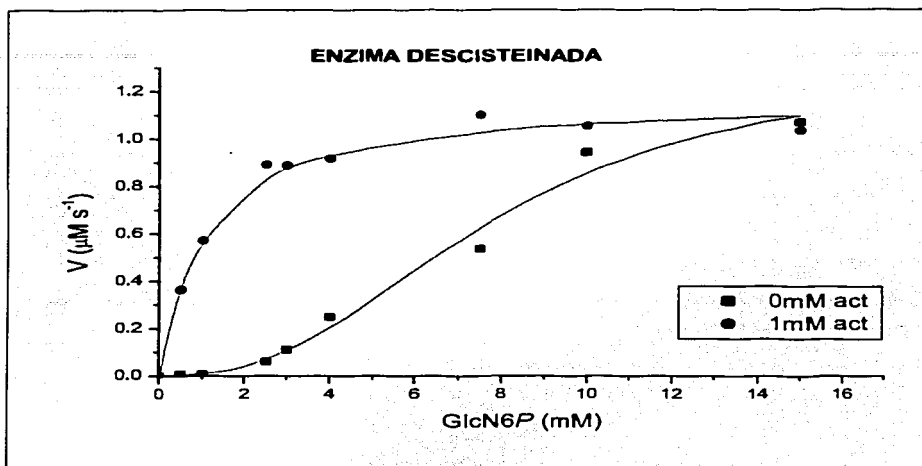


Figura 4. Comportamiento cinético de la GlcN6P desaminasa descisteinizada (Cys118Ser, Cys228Ser, Cys239Ser).

Condición: 0mM activador

Modelo: Hill

V_{max} 1.103 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 125.23 s^{-1}
 $K_{0.5}$ 9.790 mM
 h 2.364

Condición: 1mM activador

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 1.182 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 132.10 s^{-1}
 K_M 0.336 mM

La idea de introducir sondas para monitorear los cambios conformacionales se basa en el uso de sondas reactivas y específicas a grupos SH (debido a que el nucleófilo sulfihídrido que es el más reactivo en las proteínas), por tal motivo la introducción de las sondas en los sitios específicos a utilizar depende de la creación de mutantes con cisteínas, sin embargo debido a que la enzima GlcN6P desaminasa en su forma silvestre contiene cuatro cisteínas⁴, estas deben ser substituidas por otro aminoácido sin que afecte considerablemente las propiedades cinéticas del sistema, en este caso fueron substituidas por

⁴ Cys118, Cys219, Cys228 y Cys239

serinas, a excepción de la Cys219 que es crítica para la estabilidad de la enzima (datos no mostrados) además, esta posición no interfiere en el marcaje específico por no estar accesible al solvente, ya que se encuentra en la parte interna de la enzima.

La enzima descisteinizada no presenta cambios en sus propiedades cinéticas ya que la k_{cat} se mantiene alrededor de $130s^{-1}$ con y sin activador, presentando también la curva de velocidad tipo sigmoidea en ausencia de activador e hiperbólica en presencia de activador con una cooperatividad similar (h de 2.36), por lo que la enzima descisteinizada al igual que la silvestre presenta una diferencia en la catálisis en presencia y ausencia de activador, lo que a su vez nos indica que el proceso catalítico está relacionado directamente con la interacción de el activador.

6.1.4 Mutante His164Cys-mbm

La mutante His164Cys-mbm se creó a partir de la mutante descisteinizada y posteriormente se modificó químicamente con el mbm, esta mutante presenta una disminución de alrededor del 80% en cuanto a la k_{cat} con respecto a la enzima descisteinizada, sin embargo las $K_{0.5}$ y K_M son muy semejantes por lo que se sigue manteniendo el comportamiento cooperativo positivo reflejado por la curva sigmoidea en ausencia de activador y la forma hiperbólica en presencia del activador, en cuanto a la cooperatividad reflejada por el parámetro h de la ecuación de Hill, en esta mutante modificada ya químicamente muestra un ligero aumento de h de 2.36 a una h de 2.85. Con los parámetros anteriores la mutante His164Cys-mbm, se observa que la modificación química no inactiva a la enzima y con lo cual es posible monitorcarla a través de experimentos de fluorescencia con el mbm unido.

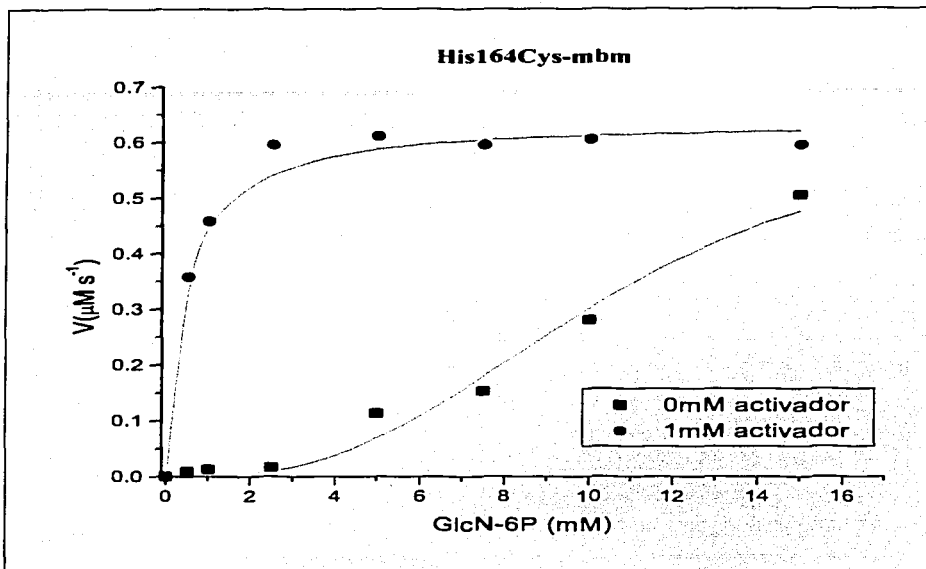


Figura 10. Comportamiento cinético de la mutante His164Cys-mbm

Condición: 0mM activador

Modelo: Hill

V_{max} 0.456 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 16.86 s^{-1}

$K_{0.5}$ 6.324 mM

h 2.858

Condición: 1mM activador

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.634 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 21.13 s^{-1}

K_M 0.357 mM

A continuación se muestran las propiedades fisicoquímicas y fluorescentes del mbm que utilizaremos como sensor para analizar las interacciones de la enzima con sus ligandos.

6.2 Propiedades de la sonda fluorescente monobromobimano.

6.2.1 Espectros de absorción y emisión de fluorescencia

El espectro de absorción del mbm muestra dos máximos de absorción a longitudes de onda máxima (λ_{max}) de 246nm y 398nm (figura 5a), la λ de 398nm es la más apropiada para el diseño experimental de fluorescencia, ya que a esta λ no interfiere con la fluorescencia intrínseca de la enzima (fluorescencia intrínseca a partir de los aminoácidos triptofanos, tirosinas y fenilalaninas los cuales tienen una λ_{ex} entre 280 y 295 nm y una λ_{em} alrededor de 300 a 350nm). En la figura 5b se muestra el espectro de fluorescencia del mbm utilizando una λ_{ex} de 381nm y un barrido de emisión λ_{em} de 400 a 600nm, mostrando un λ_{max} a 486nm. La λ_{ex} de 381nm fue utilizada por que es la λ_{max} del mbm unido a proteínas (Mansoor S.E., 1999).

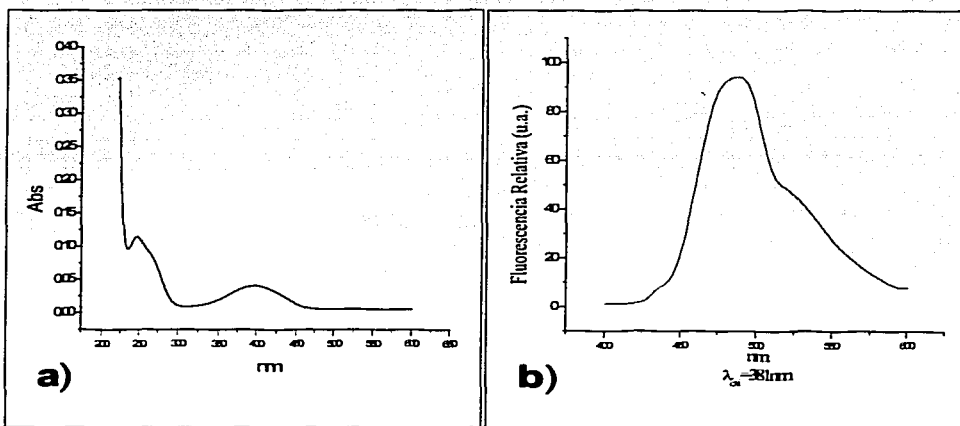


Figura 5. Espectros de monobromobimano (concentración 73.2 μ M). A) Absorción y B) Fluorescencia $\lambda_{ex}=381nm$ y $\lambda_{em}=400-600nm$.

El mbbm es un compuesto de aspecto ligeramente amarillo, estable al ambiente, fotosensible, por lo que el compuesto una vez preparado o cuando esta unido a la proteína se debe proteger de la luz, tiene una absorptividad molar de $\epsilon_{380}=5000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Se ha reportado que el mbbm es altamente sensible a los cambios de polaridad del medio (Edward M. Kosower, 1986), también se ha reportado que es sensible a los cambios de accesibilidad al solvente en la enzima lisozima T4 que correlacionan con la estructura secundaria de la misma (Mansoor, S.E., 1999), estas propiedades del mbbm son las que se utiliza para estudiar los cambios conformacionales asociados con la unión de los ligandos de la GlcN6P desaminasa, una ventaja adicional que se tiene al utilizar esta sonda fluorescente es que dada su absorptividad molar unido a la proteína la cual es grande ($\epsilon_{380}=5000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), las concentraciones de proteína modificada para trabajar son del orden de μM , lo que permite reducir "costos" comparado con otras técnicas como RMN o EPR, que son otras técnicas que permiten obtener información estructural de proteínas en solución.

6.2.2 Mbbm-cisteína en diferentes ambientes de polaridad relativa

El mbbm en solución presenta efectos espectroscópicos variables (fluorescentes) atribuidos principalmente a la geometría del compuesto, presenta dos isómeros conformacionales generados por la flexibilidad entre los dos anillos de cinco miembros unidos por los dos nitrógenos (Kosower y col, 1986). Para evitar comportamientos anómalos y asemejar las condiciones en las que el mbbm estará unido a la enzima se hizo reaccionar con cisteínas libres, lo cual permite que la señal de fluorescencia sea estable en los diferentes ambientes de polaridad relativa.

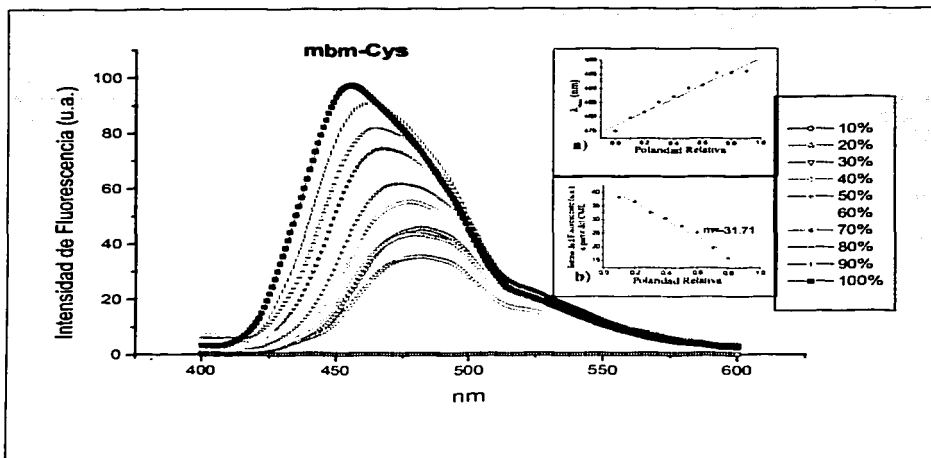


Figura 6. Espectro de fluorescencia del mbm-cys en diferentes ambientes de polaridad relativa (mezclas binarias de 0% a 100% de dioxano) λ_{ex} =381nm y λ_{em} =400 a 600nm.

Para lograr un aumento en la polaridad del medio se realizaron mezclas binarias de amortiguador Tris 50mM pH=7.5 y dioxano obteniendo así diferentes polaridades.

El mbbm una vez que ha reaccionado con las cisteínas libres muestra una tendencia en dos efectos muy marcados, el aumento en la intensidad de fluorescencia ($m=31.71$), y el corrimiento en el centro de masas espectral (CME) hacia menores λ al disminuir la polaridad del medio. Estos efectos muestran una tendencia lineal tanto en el corrimiento del CME como en el aumento de la intensidad de fluorescencia (figuras 6a y 6b), este fenómeno mostrado por parte del mbbm, es de gran importancia para el propósito de sensar los cambios que ocurren en una proteína, ya que los pequeños arreglos conformacionales que llevan a cabo las proteínas ocasionan que el microambiente en una zona específica sea mas o menos polar.

6.2.3 Mutante His164Cys-mbm en diferentes ambientes de polaridad relativa

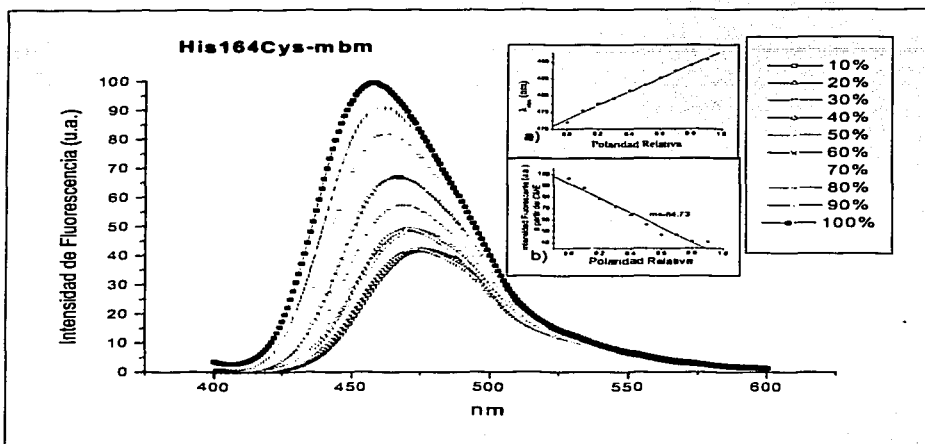


Figura 7. Espectros de fluorescencia de la mutante His164Cys-mbm en diferentes ambientes de polaridad relativa (mezclas binarias de 0% a 100% de dioxano), λ_{ex} =381nm y λ_{em} =400-600nm.

La sonda fluorescente (mbm) tiene un comportamiento característico importante unido a la proteína bastante estable (no presenta los efectos geométricos ya mencionados) y es altamente sensible (mostrando un rendimiento cuántico aproximadamente 400 veces mayor, A.E. Radkowsky, 1986), con lo anterior se asegura que la sonda efectivamente se encuentra unida a la proteína.

Los espectros de fluorescencia de la mutante His164Cys-mbm presentan un aumento en la intensidad de fluorescencia con una pendiente de -64.7 (figura 7b), y un corrimiento en el CME (figura 7a) en diferentes ambientes de polaridad relativa, es decir se hicieron mezclas binarias dioxano:amortiguador que mostraron un patrón muy similar al del mbm-cys. Un dato significativo es que la pendiente de la intensidad fluorescente es el

doble en comparación con el mbm unido a cisteína por lo tanto este dato también refleja sensibilidad mayor del mbm unido a la proteína.

El aumento en la intensidad de fluorescencia y el corrimiento del CME hacia menores λ , corresponde a la disminución de la polaridad relativa del medio (cuando aumenta la concentración de dioxano); con lo anterior se concluye que al estar sensando el ambiente del mbm, este mantiene sus características espectroscópicas (intensidad y CME) al encontrarse unido a la enzima, con lo cual es posible monitorcar regiones de la enzima al interactuar con sus ligando (activador e inhibidor) de manera dinámica.

Un aspecto importante que cabe mencionar es que al disminuir la polaridad del medio con el dioxano, estamos afectando algunas propiedades de la propia enzima como es su actividad y estabilidad a polaridades muy bajas, pero para nuestro propósito de mostrar los efectos del mbm con el ambiente tanto la pérdida de actividad como la desestabilización de la enzima no son factores que influyen directamente en el efecto mostrado por parte del mbm.

6.3 Mutante His164Cys-mbm



Figura 8.⁵ Mutante His164Cys (conformero T). En la parte central se observa la posición de la mutante en dos monomero, en la parte izquierda se muestra la superficie en una vista lateral y en la parte derecha se presenta el ambiente por parte de los aminoácidos circunvecinos.

Tabla 1. Área superficial accesible a solvente*.

Mutante	Confórmero T (Å ²)	Confórmero R (Å ²)	Diferencia T-R (Å ²)
His164Cys	137.66	114.74	22.92

En la figura 8 se muestra la región en la cual se llevó a cabo el marcaje de la enzima, esta posición cuenta con un área accesible al solvente de 137.66 Å² en el confórmero T, (estado en el que se lleva a cabo la modificación química) y una distancia de 27.94 Å entre los residuos más cercanos de cada monómero, que es una distancia considerable para que puedan interactuar entre ellos. Con la introducción de la sonda fluorescente se puede sentir los cambios de área accesible al solvente entre los dos confórmeros de la enzima (confórmero T y R), aprovechando la gran sensibilidad del mbm a los cambios de ambiente, con esta información y con datos de área accesible al solvente, estructurales y cinéticos se pueden relacionar con la transición entre los confórmeros T y R que presenta la enzima GlcN6P desaminasa.

⁵ Imágenes realizadas con el programa PyMOL is Copyright 1998-2003 by Warren L. DeLano of DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

⁶ Cálculos realizados con el programa GETAREA 1.1 a partir de las estructuras cristalográficas 1HOT.pdb y 1HOR.pdb.

En la posición 164 los aminoácidos que se encuentran directamente interactuando con el mbm a un radio de 5 Å se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Aminoácidos de la posición 164 a un radio de 5 Å.

Conformero I	Conformero R
Leu-162	Leu-162
Thr-163	Thr-163
Asp-165*	Asp-165*
Thr-166	Thr-166
Arg-167	Arg-167
Val-168	Val-168
Ala-169	
Val-178	

*aminoácidos que transfieren electrones

En esta posición solamente el ácido aspártico se encuentra entre los aminoácidos que transfieren electrones y que pudieran ocasionar un efecto de apagamiento (Yu Chen, 1998), es importante notar que el conformero T tiene interactuando dos aminoácidos más (Ala 169 y Val 178).

6.3.1 Apagamiento de la fluorescencia

El efecto del apagamiento de la fluorescencia con el KI en esta mutante muestra un proceso bifásico de apagamiento, en el cual en una primera fase este efecto es más notorio con una pendiente de -153.80 y en una segunda con una pendiente de -11.29 (figura 9a). De manera general se refleja la interacción entre el sensor y el KI con lo que se muestra que el mbm se encuentra en una posición accesible al solvente y con un patrón de apagamiento definido por estas dos fases de apagamiento. Este cambio en pendiente muestra, que el proceso de apagamiento se pueden relacionarse con la pequeña asimetría que presenta la estructura cristalográfica en la cual tres de las posiciones mutadas en cada monómero presentan contactos diferentes con respecto a los otros tres restantes.

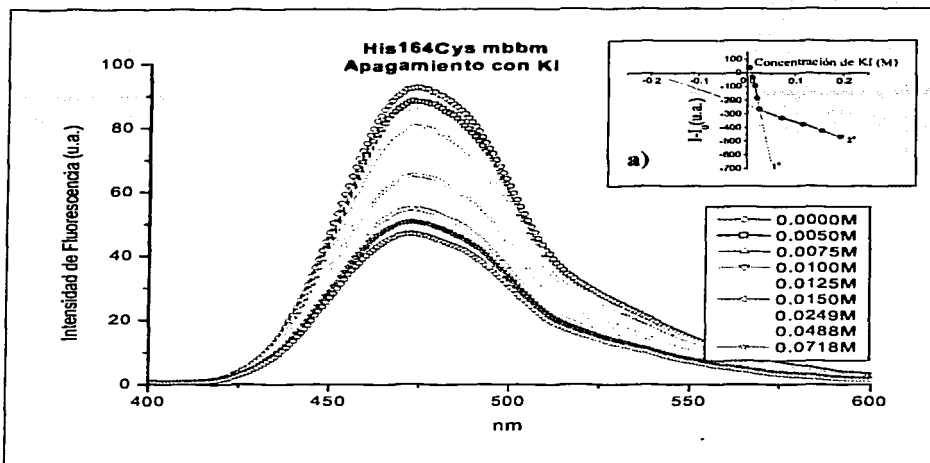


Figura 9. Espectros de fluorescencia de la mutante His164Cys-mbbm titulándola con KI (apagamiento) $\lambda_{ex}=381\text{nm}$ y $\lambda_{em}=400-600\text{nm}$.

En el apagamiento de los fluoróforos naturales de las proteínas intervienen diferentes factores entre los cuales podemos mencionar el apagamiento por interacción directa con el solvente, por transferencia de protones y electrones por parte de los aminoácidos de las cadenas laterales (Yu Chen, 1998).

6.3.2 Cinética a diferentes concentraciones de activador

La cinética de la mutante His164Cys-mbbm con diferentes concentraciones de activador, son ajustadas tanto a la ecuación de Hill como a la de Michaelis-Menten según el comportamiento más adecuado que muestran los resultados, en este caso las cuatro concentraciones más bajas son ajustadas a la ecuación de Hill con una r^2 de 0.978 y las

ultimas concentraciones (más altas) son ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten con una r^2 de 0.990.

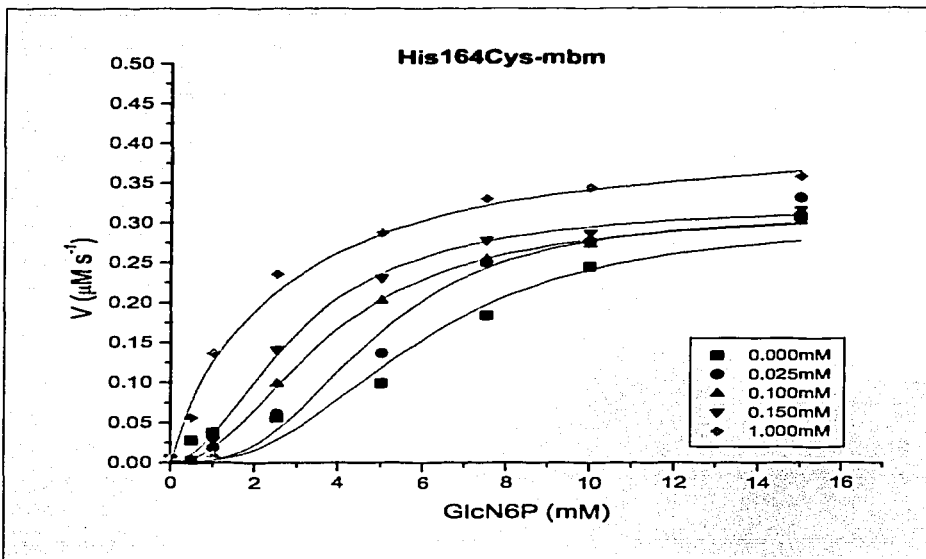


Figura 11. Comportamiento cinético de la mutante His164Cys-mbm a diferentes concentraciones de activador.

Modelo: Hill

Condición: 0 mM activador

V_{max} 0.300 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 10.00 s^{-1}

$K_{0.5}$ 5.875 mM

h 2.642

Condición: 0.025 mM activador

V_{max} 0.310 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 10.33 s^{-1}

$K_{0.5}$ 4.810 mM

h 2.900

Condición: 0.1 mM activador

V_{max} 0.313 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 10.43 s^{-1}

$K_{0.5}$ 3.726 mM

h 2.103

Condición: 0.15mM activador

V_{max} 0.322 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 10.73 s^{-1}

$K_{0.5}$ 2.980 mM

h 1.943

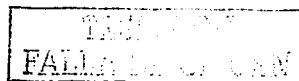
Modelo: Michaelis-Menten

Condición: 1.0 mM activador

V_{max} 0.471 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 15.70 s^{-1}

K_M 0.864 mM

Los parámetros cinéticos nos muestran de manera general el efecto que produce el activador a la enzima, en cuanto a su actividad manifestada por su k_{cat} la cual se incrementa al aumenta la concentración del activador desde una k_{cat} de 10 a 15.70 s^{-1} , sin embargo este



parámetros no es el más representativo del efecto que lleva a cabo el activador; pero si lo son las $K_{0.5}$ y las K_M donde se observa que al aumentar las concentraciones de activador estas disminuyen de manera importante, lo que indica que la afinidad del sustrato se incrementa de manera considerable y por lo tanto se vislumbra que el activador favorece el conformero más activo (conformero R).

6.3.3 Titulación con activador en fluorescencia

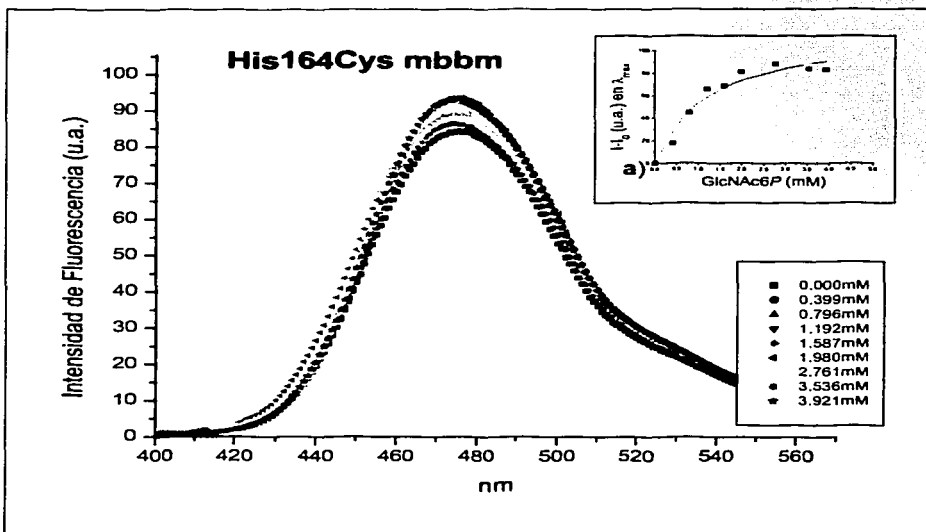


Figura 12. Espectros de fluorescencia de la mutante His164Cys-mbm activador λ_{ex} =381nm y λ_{em} =400-600nm.

En la titulación de la mutante His164Cys-mbm con el activador se observa un aumento en la intensidad fluorescente con un CME constante, este comportamiento en los espectros refleja un cambio en el microambiente por parte de la posición 164 y como

consecuencia también un cambio en la enzima, comprobándose el efecto mostrado cinéticamente.

Este fenómeno lo podemos correlacionar estructuralmente gracias a que se cuenta con las estructuras cristalográficas de los conformeros de la enzima con activador en su conformero R (I_{HOR}) y sin activador en su conformero T (I_{HOT}). Como la posición 164 en el conformero R se encuentra menos accesible al solvente (pasa a un microambiente más hidrófobico; tabla 1, pagina 46), presenta un aumento de la intensidad de fluorescencia cuando la enzima pasa de su conformero T al R, como se muestra en los espectros de la mutante en los diferentes ambiente de polaridad (figura 7, pagina 44). El cambio de microambiente en los aminoácidos es muy pequeño, pero con la gran sensibilidad del mbm es posible determinar estas pequeñas variaciones que ocurren a nivel molecular entre los dos conformeros, por lo tanto este fenómeno revela la transición conformacional entre T y R en solución.

En la figura 12.a, donde se grafica la diferencia de intensidades fluorescentes ($I_0 - I$) a partir de la λ_{max} con respecto a la concentración de activador, nos refleja el cambio conformacional que se lleva a cabo, donde se observa que este cambio es mayor a concentraciones mínima, lo que se reflejaría en una mayor afinidad en estas concentraciones; asemejándose este comportamiento con los datos cinéticos, también se visualiza que aproximadamente se requiere de una concentración de 1mM de activador para que se lleve a cabo toda la transición conformacional.

6.3.4 Cinética a diferentes concentraciones de inhibidor

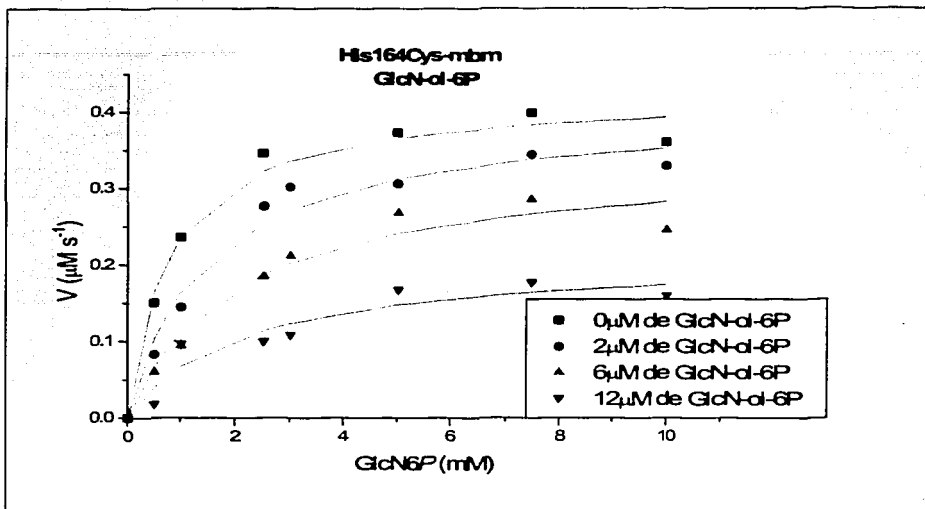


Figura 13. Comportamiento cinético de la mutante His164Cys-mbm a diferentes concentraciones de inhibidor.

Condición: 0 μM de inhibidor

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.428 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 11.709 s^{-1}

K_M 1.403 mM

Condición: 2 μM de inhibidor

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.423 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 11.572 s^{-1}

K_M 1.626 mM

Condición: 6 μM de inhibidor

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.339 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 9.143 s^{-1}

K_M 2.024 mM

Condición: 12 μM de inhibidor

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.211 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 5.455 s^{-1}

K_M 2.139 mM

En la figura 13 se presentan las cinéticas de inhibición, las cuales son ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten, mostrando de manera general un aumento en la K_M y una disminución en la k_{cat} lo que indica una disminución en la afinidad por el sustrato, efecto contraria al que muestra el activador. Este inhibidor es un compuesto análogo al sustrato,

por lo que se considera un inhibidor competitivo con una $K_i=3.7\mu\text{M}$ y por lo tanto tiene una mayor afinidad que el sustrato con una diferencia al menos de 3 órdenes de magnitud.

6.3.5 Titulación con inhibidor en fluorescencia

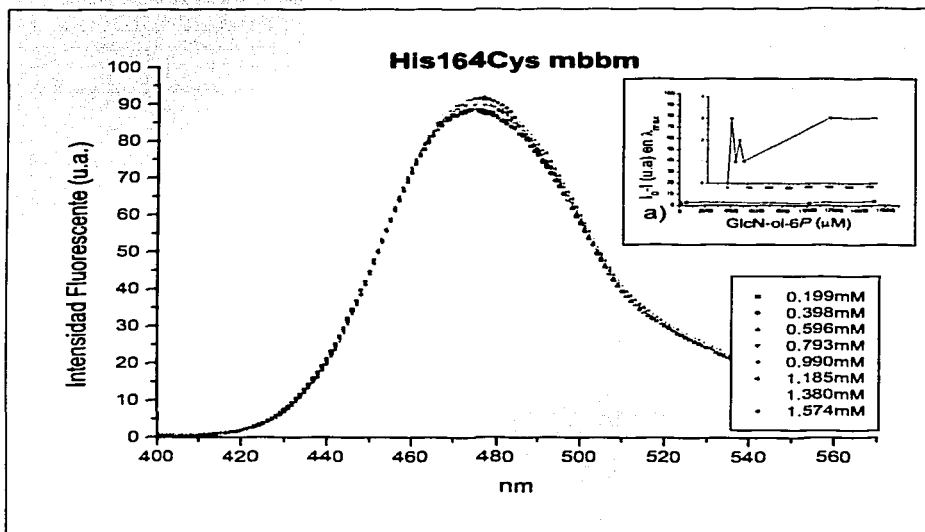


Figura 14. Espectros de fluorescencia de la mutante His164Cys-mbbm inhibidor $\lambda_{ex}=381\text{nm}$ y $\lambda_{em}=400-600\text{nm}$.

En la figura 14 se muestra la gráfica entre la concentración de inhibidor y la intensidad fluorescente, donde esta intensidad no cambia considerablemente en comparación con el activador (figura 12, página 50), éste poco cambio se puede visualizar en la figura 14.a donde se presenta una ampliación de los valores mínimos y la diferencia de cambio es casi imperceptible en toda la titulación; la intensidad fluorescente mantiene el CME constante (487nm).

Por lo tanto la titulación con el inhibidor competitivo nos muestra que el cambio conformacional no se lleva a cabo con este ligando, ya que las intensidades fluorescentes de la sonda unida a la enzima (mbbm), se mantiene constante al incrementar la concentración del inhibidor, sin embargo esto no quiere decir que al llevar a cabo la catálisis con el sustrato (GlcN6P) ocurra lo mismo. Este resultado nos indica que la enzima no lleva a cabo algún movimiento conformacional al interactuar con el inhibidor, a pesar de ser muy afín a la enzima ($K_i=3.7\mu\text{M}$).

6.4 Mutante Ser171Cys-mbm



Figura 15. Mutante Ser171Cys (conformero T). En la parte central se muestra la posición mutada en forma general, a la izquierda un acercamiento, mostrando la superficie y a la derecha el microambiente de la posición.

Tabla 3. Área superficial accesible a solvente.

Mutante	Conformero T (Å ²)	Conformero R (Å ²)	Diferencia T-R (Å ²)
Ser171Cys	5.88	7.34	-1.46

Tabla 4. Aminoácidos de la posición 171 a un radio de 5 Å.

Conformero T	Conformero R
Thr-166	Arg-167
Arg-167	Val-168
Val-168	Ala-169
Ala-169	Asn-170*
Asn-170*	Arg-172
Arg-172	Phc-173
Phc-173	Phc-174
Phc-174	Asp-175*
Asn-176*	Asn-176*
Asp-177*	Asp-177*
Val-178	Val-178
Val-181	Val-181

*aminoácidos que transfieren electrones

La figura 15 muestra de manera general la posición a sensar en esta mutante, esta posición tiene poca área accesible al solvente en el estado en que se modifica, además de que entre monómeros las posiciones se encuentran a 20.43 Å de distancia lo que puede ser un factor para que la enzima pierda estabilidad y movilidad. Los aminoácidos que se encuentran a un radio de 5 Å con respecto a la posición 171 (tabla 4), presentan diferente interacción en cada conformero (T y R), el Thr 166 se observa en el estado T y el Asp 175 se observa en el estado R, este cambio puede influir en los experimentos de fluorescencia,

ya que el Asp es un aminoácidos que es capaz de transferir energía por medio de transferencia de electrones.

6.4.1 Apagamiento de la fluorescencia

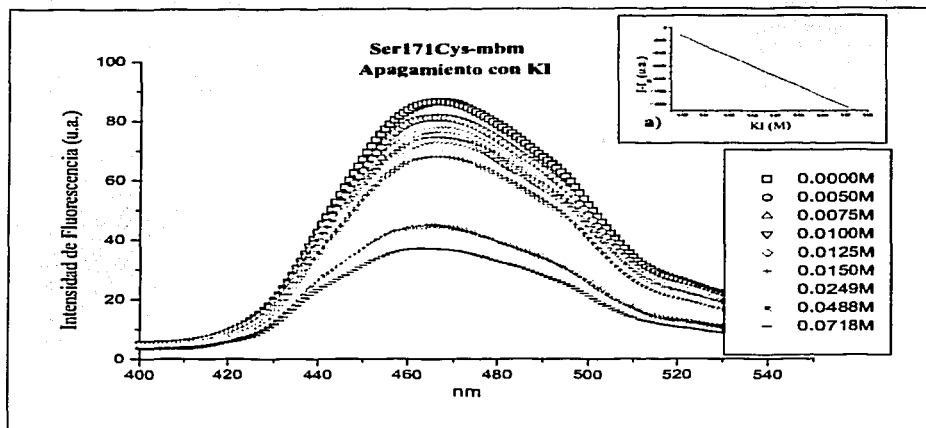


figura 16. Espectros de fluorescencia de la mutante Ser171Cys-mbm titulándola con KI (apagamiento) $\lambda_{ex}=381\text{nm}$ y $\lambda_{em}=400-600\text{nm}$.

El apagamiento de la mutante Ser171Cys-mbm mostró una sola tendencia (figura 16a), sin mostrar una doble tendencia como en el caso de la His164Cys-mbm, los espectros de fluorescencia son relativamente diferentes a los observados con la mutante His164Cys-mbm (figura 9, pagina 48), en lo que concierne a la forma del espectro; variación que es una buena señal de que la posición modificada tiene sus propias características. Con los datos de área accesible al solvente mostrados en la tabla 3, esta posición muestra una menor accesibilidad al solvente que la posición 164, por lo que la sensibilidad del mbm disminuye considerablemente.

6.4.2 Comportamiento cinético

Los datos cinéticos obtenidos de la mutante Ser171Cys-mbm son diferentes a los de la enzima silvestre y a los de la enzima descisteinizada en lo que respecta a la actividad (K_{cat}), mostraron actividades bajas del orden de 3.49 s^{-1} (un 97% menos con respecto a la enzima descisteinizada), pero sin embargo mantiene propiedades de cooperatividad en ausencia del activador (con una h de 2.41).

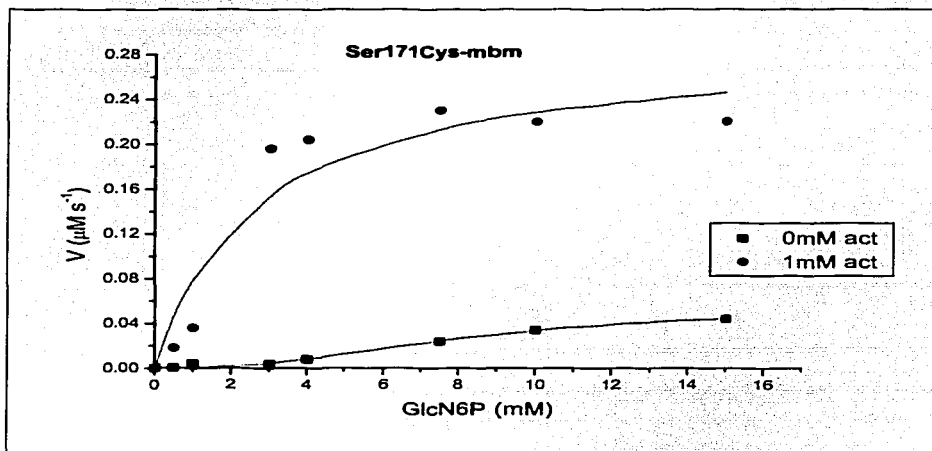


Figura 17. Comportamiento cinético de la mutante Ser171Cys-mbm.

Condición: 0mM activador

Modelo: Hill

V_{max} 0.038 $\mu\text{M s}^{-1}$ K_{cat} 0.157 s^{-1}
 $K_{0.5}$ 8.222 mM
 h 2.419

Condición: 1mM activador

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.236 $\mu\text{M s}^{-1}$ K_{cat} 3.494 s^{-1}
 K_M 2.454 mM

Este comportamiento cinético es atribuido principalmente a factores relacionados con la zona en que se realizó la mutación, ya que esta posición se encuentra orientada hacia la parte interna de la enzima, además de que esta situación hace más difícil la modificación

química aunado a la poca área accesible al solvente con que cuenta esta posición (5.88 Å). Con todo lo anterior esta mutante se comporto en general muy inestable tanto en los procesos de purificación como en los de modificación química obteniendo una cantidad mínima para procesarla.

6.4.3 Titulación con activador en fluorescencia

En la figura 18 se observan los espectros de fluorescencia de la mutante Ser171Cys-mbm al ser titulada con activador, mostrando una disminución en la intensidad fluorescente al aumentar la concentración del activador (efecto contrario al que muestra la mutante His164Cys-mbm).

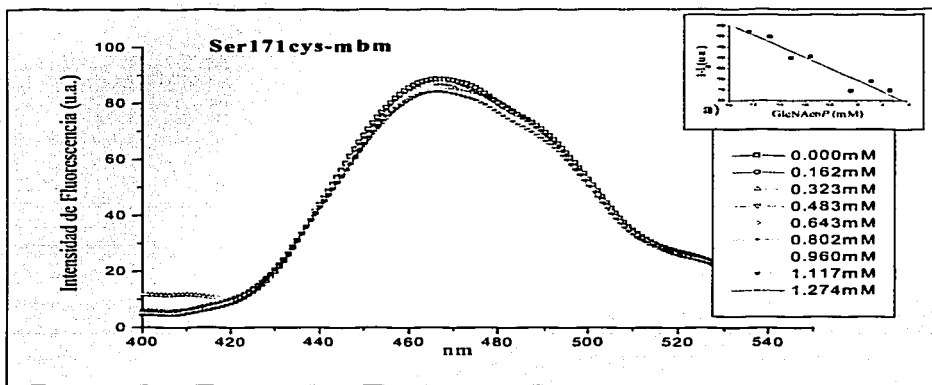


Figura 18. Espectros de fluorescencia de la mutante Ser171Cys-mbm con activador, λ_{ex} =381 nm y λ_{em} =400-600nm.

Este efecto muestra una tendencia lineal pero irregular (figura 18a), esta posición muestra una desventaja ya que el cambio de área superficial accesible al solvente es mínima (1.46 \AA^2) entre el conformero T y el R lo que hace que la posición no tenga un gran cambio

de ambiente y por lo tanto el mbm no es tan sensible a este cambio. Al ser un cambio negativo nos indica que se encuentra más accesible la posición en el conformero R y al disminuir la intensidad el mbm nos indica que esta posición pasa a un ambiente más polar, por lo tanto la titulación con el activador nos manifiesta que el activador favorece al conformero R, y aunque esta mutante nos muestra un efecto contrario a la mutante His164Cys-mbm en cuanto a la fluorescencia, nos indica que existe una relación con los datos de accesibilidad al solvente que predice este comportamiento fluorescente.

6.4.4 Titulación con inhibidor en fluorescencia

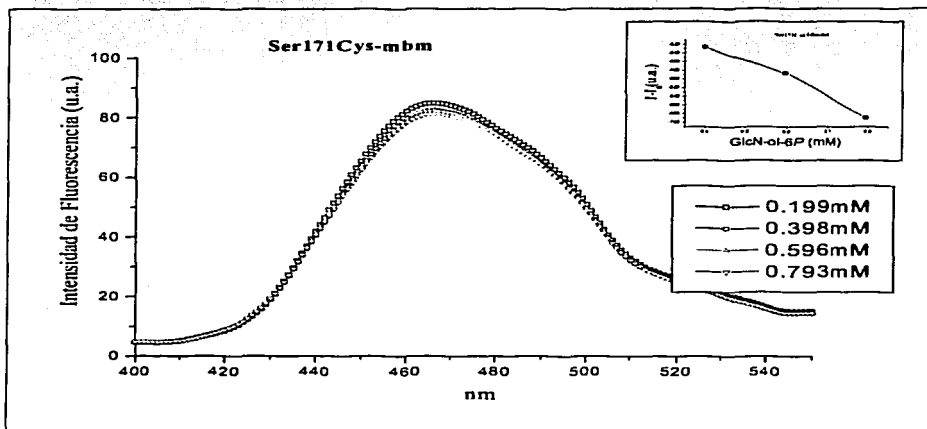


Figura 19. Espectros de fluorescencia de la mutante Ser171Cys-mbm inhibidor λ_{ex} =381nm y λ_{em} =400-600nm.

En la mutante Ser171Cys-mbm al ser titulada con el inhibidor muestra una disminución en la intensidad fluorescente, con un cambio no muy considerable entre cada punto debido posiblemente a los mismos argumentos que se exponen para el caso de la

titulación con el activador. La tendencia que muestra la titulación no es muy representativa puesto que esta titulación se realizó con pocos puntos por la poca estabilidad mostrada por parte de la mutante al realizar la titulación, sin embargo es notorio que el efecto de la disminución de la intensidad de fluorescencia se presenta (figura 19a).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5 Mutante Phe174Cys-mbm



Figura 20. Mutante Phe174Cys (conformero T). En la parte central se muestra la posición mutada en el hexamero, en la parte izquierda se encuentra un monomero mostrando su accesibilidad al solvente que presenta esta posición y en la parte derecha se observa el microambiente.

Tabla 5. Área superficial accesible a solvente.

Mutante	Conformero T (Å^2)	Conformero R (Å^2)	Diferencia T-R (Å^2)
Phe174Cys	8.62	9.87	-1.25

La mutante Phe174Cys posee características semejantes a la mutante Ser171Cys como las que se pueden observar a partir de la figura 20 y la tabla 5, las principales son la poca área accesible al solvente en el estado a modificar (conformero T) y el cambio de ambiente hidrófobico a hidrófilico en la transición el cual es mínimo (1.25 Å^2).

Tabla 6. Aminoácidos de la posición 174 a un radio de 5 Å.

Conformero T	Conformero R
His-81*	Glu-83*
Glu-83*	Asn-170*
Asn-170*	Ser-171
Ser-171	Arg-172
Arg-172	Phe-173
Phe-173	Asp-175*
Asp-175*	Asn-176*
Asn-176*	Asp-177*
Asp-177*	Gln-180*
Gln-180*	Val-181
Val-181	

*aminoácidos que transfieren electrones

En la tabla 6 se presentan los aminoácidos que se encuentran en contacto directo a un radio de 5 Å en los dos conformeros, siendo solamente la His 81 el único aminoácidos que varía de un conformero a otro, concordando este dato con la poca diferencia que

presenta esta mutante en cuanto a su accesibilidad al solvente y por lo tanto su baja movilidad de la posición.

6.5.1 Apagamiento de la fluorescencia

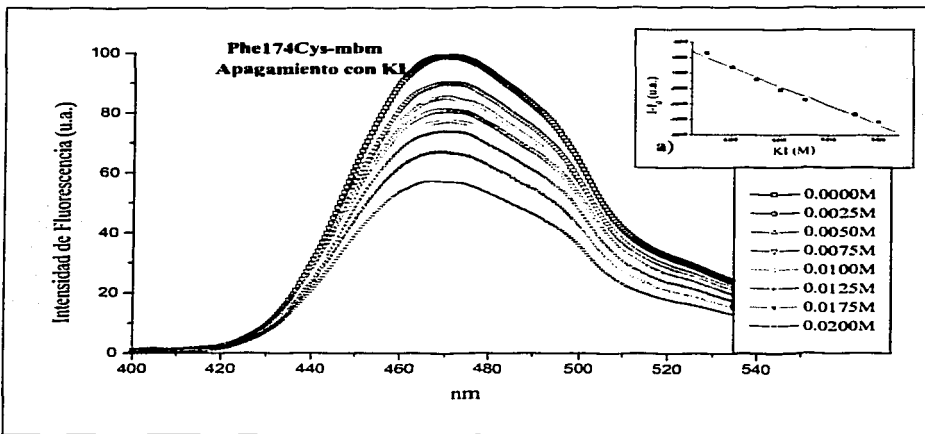


Figura 21. Espectros de fluorescencia de la mutante Phe174Cys-mbbm titulándola con KI (apagamiento) $\lambda_{ex}=381\text{nm}$ y $\lambda_{em}=400-600\text{nm}$.

En la figura 21 se muestra los espectros de fluorescencia del apagamiento con el KI, este efecto muestra una relación lineal como se observa en la figura 21a. este apagamiento es muy similar al mostrado por las mutantes anteriores (His164Cys mbbm y Ser171Cys mbbm). Sin embargo también muestra un espectro característico.

6.5.2 Comportamiento cinético

El comportamiento cinético de la mutante Phe174Cys-mbm es muy similar al de la mutante Ser171Cys-mbm, mostrando pequeñas diferencias con respecto a ésta, aunque presenta una actividad mayor que la mutante Ser171Cys-mbm y menor a la mutante His164Cys-mbm, con una pérdida de actividad del 90% con respecto a la enzima desisteinizada.

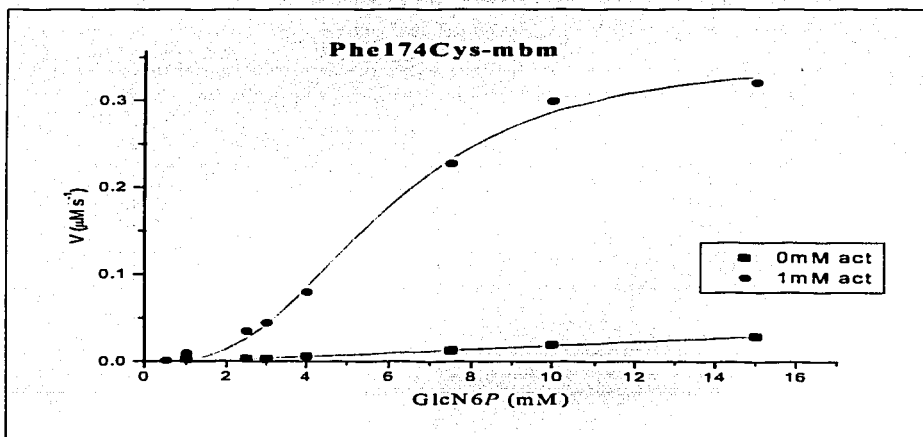


Figura 22. Comportamiento cinético de la mutante Phe174Cys-mbm en velocidades iniciales.

Condición: 0mM activador

Modelo: Hill

V_{max} 0.213 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 7.11 s^{-1}

$k_{0.5}$ 9.453 mM

h 1.338

Condición: 1mM activador

Modelo: Michaelis-Menten

V_{max} 0.296 $\mu\text{M s}^{-1}$ k_{cat} 9.86 s^{-1}

K_M 4.189 mM

El comportamiento cinético también mantiene sus propiedades de ajuste a las ecuaciones de Hill y Michaelis-Menten en ausencia y presencia de activador respectivamente, siendo solamente el parámetro h (número de Hill) el que varía disminuyendo de 2.4 a 1.33 en esta mutante con lo que nos indica una pérdida de

cooperatividad en ausencia del activador, siendo esta una característica importante para los objetivos de sensar los cambios con la unión del ligando de la enzima (activador en este caso).

6.5.3 Titulación con activador en fluorescencia

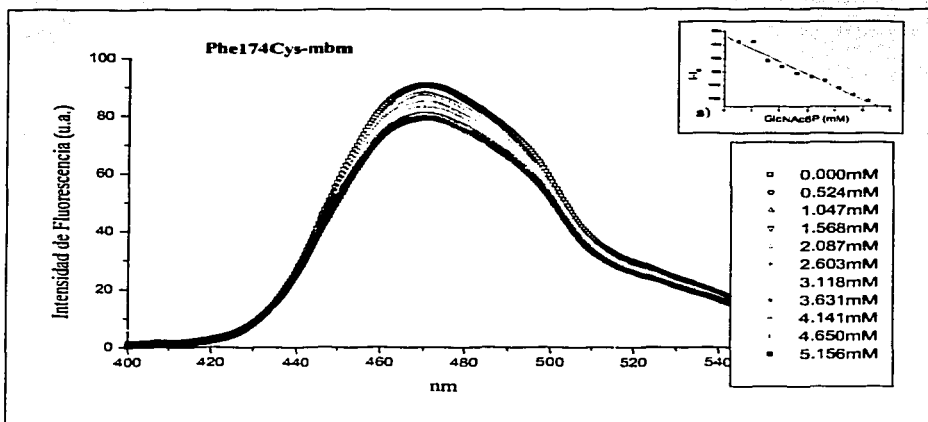


Figura 23. Espectros de fluorescencia de la mutante Phe174Cys-mbm activador $\lambda_{ex}=381\text{nm}$ y $\lambda_{em}=400\text{-}600\text{nm}$.

La figura 23 muestra un efecto similar a la mutante Ser171Cys-mbm, disminuye la intensidad fluorescente al ser titulada con el activador, esta titulación con activador muestra una relación lineal como se observa en la 23a. El comportamiento mostrado por parte de esta mutante como también por la mutante Ser171Cys-mbm es esperado cuando aumenta el área accesible al solvente, ya que en ambos casos al adicionar el activador a la enzima pasa a un ambiente más polar y por lo tanto el mbm tiende a disminuir su intensidad de fluorescencia.

6.5.4 Titulación con inhibidor en fluorescencia

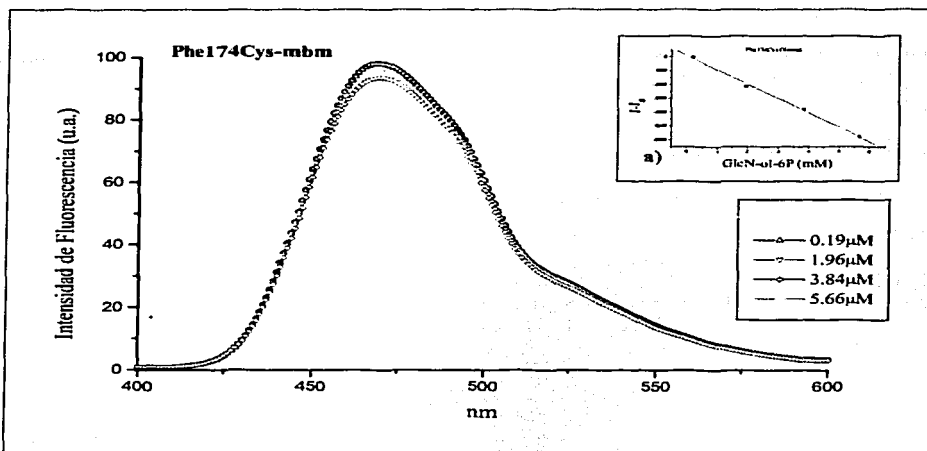


Figura 24. Espectros de fluorescencia de la mutante Phe174Cys-mbm inhibidor λ_{ex} =381nm y λ_{em} =400-600nm.

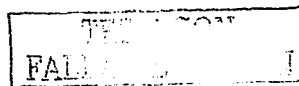
La figura 24 muestra la titulación de la mutante Phe174Cys-mbm, indicando una disminución en la intensidad fluorescente al adicionarle diferentes concentraciones de el inhibidor mostrando una tendencia lineal (figura 24a) continuando con el mismo patrón de la mutante Ser 171Cys-mbm.

7. Conclusiones

El marcaje de la enzima GlcN6P desaminasa de *E. coli*. en posiciones específicas con la sonda fluorescente mbbm nos ayuda a monitorear los cambios conformacionales que se llevan a cabo en solución, mostrando ventajas de esta sonda como son la gran sensibilidad de detección a los cambios de polaridad del medio, la especificidad de la zona a sensar (regiones locales), la gran reactividad de la reacción de modificación química.

Para diseñar los sitios a sensar es de gran importancia tomar en cuenta ciertas características para que el marcaje sea el óptimo, como es la estructura tridimensional de las proteínas para disminuir las perturbaciones estéricas, la modificación en zonas de α -hélices las cuales son más estables para llevar a cabo la modificación química, así como los datos de área superficial accesible al solvente por dos razones principales, la primera para que la modificación química sea óptima y la segunda para no desestabilizar la proteína por cambios intramoleculares que se pudieran ocasionar. Entonces, uno de los requerimientos básicos para que este sistema de marcaje de sitios específicos funcione óptimamente, es necesario que las zonas donde se muten las cisteínas se encuentren expuestas y accesibles a solvente para que estas cisteínas sean altamente reactivas, además de que la mutación no sea crítica en su microambiente (contactos entre los aminoácidos a su alrededor). Sin embargo si existen cisteínas en zonas internas de la proteína estas no interfieren en la modificación química y pueden ser importantes en términos de estabilidad de la misma.

Con lo que respecta a la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. ésta mantiene sus propiedades cinéticas (enzima silvestre) después de la mutación de tres de sus cuatro cisteínas nativas y también después de la modificación química, con lo cual es posible



senzar sus cambios conformacionales que lleva a cabo la enzima con la adición de sus ligandos (activador e inhibidor) con técnicas fluorescentes.

El mbbm es un fluoróforo muy sensible a los cambios de polaridad del medio, lo que hace que sea ideal para el estudio de los cambios conformacionales que presentan las enzimas, principalmente cuando existen regiones donde se exponen u ocultan de manera considerable entre los conformeros presentes, como en el caso de la posición 164 en la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*. Además, esta sonda es bastante estable cuando esta unida a la proteína en comparación a estar libre, que es una manera de asegurarnos de que efectivamente se encuentra unida a los residuos de cisteínas.

Con los datos de fluorescencia obtenidos con los dos ligandos, el activador alosterico (GlcNAc6P) e inhibidor competitivo (GlcN-ol-6P), el cambio conformacional de la enzima por parte de el activador es el más evidente ya que en la mutante His164Cys-mbm (mutante que funciona excelente), muestra los efectos esperados en relación principalmente con los datos de área accesible al solvente, un aumento en la intensidad fluorescente con un ligero corrimiento en el CME siendo estos datos muy confiables puesto que el efecto dilución al titular sería el contrario (disminución de la intensidad), mientras que tanto la mutante Ser171Cys-mbm como la Phe174Cys-mbm disminuyen su intensidad fluorescente concordando también con sus datos de área accesible al solvente, aunque con menos precisión. Con lo que respecta a el inhibidor los efectos mostrados no son los esperados, ya que este inhibidor al ser un análogo del sustrato se esperaba que favoreciera el conformero R y presentara los mismos efectos que el activador, sin embargo este inhibidor muestra en todas las mutantes los mismos efectos, siendo que en la mutante His164Cys-mbm tiene un efecto diferente con el activador a las dos mutantes restantes (Ser171Cys-mbm y Phe174Cys-mbm), por lo tanto basándonos en los experimentos de

fluorescencia (titulaciones con inhibidor y con KI), pareciera que la disminución de la intensidad fluorescente en todas las mutantes es influenciado por la dilución y efectos secundarios (transferencias de energía), ya que la concentración utilizada en las titulaciones son llevadas al menos tres ordenes de magnitud mayores a las que se presenta el efecto con el inhibidor cinéticamente ($K_i = 3.7 \mu\text{M}$), con lo cual se concluye que la transición conformacional de T a R se lleva a cabo solamente con el activador, sin descartar la posibilidad de que el sustrato (GlcN6P sin reducir) también ocasione la transición al conformero R por el mismo u otro mecanismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. Propuestas

Utilizar esta técnica para sensar cambios en diferentes receptores farmacológicos para el diseño de fármacos específico, ya que se pueden realizar marcajes en sistemas para estudios *in vivo*.

Las mutantes a las cuales se sustituyo el residuo en cuestión por un residuo de cisteína tienen una gran ventaja, ya que se pueden realizar modificaciones químicas con diferentes sondas fluorescentes para llevar a cabo diferentes estudios como son:

1. Estudios de anisotropía para intentar determinar detalladamente las fluctuaciones en zonas específicas de la enzima GlcN6P desaminasa.
2. Medición de distancias a través de FRET (Transferencia de Energía por Fluorescencia en Resonancia) para corroborar estos cambios conformacionales y obtener dominios característicos de movilidades.
3. Estudios con otros sensores diferentes a los fluorescentes como los de tipo NMR y EPR, que nos proporcionen información a nivel subpoblacional (detalles por zona o dominio de la enzima).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

9. Anexos

9.1 Protocolo de cinética

Facultad de Medicina UNAM Departamento de Bioquímica
Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas



PROTOCOLO DE CINETICA

CURVA PATRON

Tubo	H ₂ O (μl)	Fructosa 1mM (μl)	Incubar a 30°C por 10min. Agregar 2ml de HCl (10N) y 0.5ml de resorcinol. Incubar a 70°C por 10min. Enfriar con hielo y leer a 512nm.	[Fructosa] mM	Abs 512nm
1	200	0			
2	190	10			
3	180	20			
4	160	40			
5	140	60			
6	120	80			
7	100	100			

MEZCLA SIN ACTIVADOR

	1 TUBO	10 TUBOS
Tris HCl (1M) pH=7.7	20μl	200μl
EDTA (250mM)	20μl	200μl
H ₂ O	50μl	500μl
Total	90μl	900μl

MEZCLA CON ACTIVADOR

	1 TUBO	10 TUBOS
Tris HCl (1M) pH=7.7	20μl	200μl
EDTA (250mM)	20μl	200μl
H ₂ O	48μl	480μl
GlcNAc6P(100mM)	2μl	20μl
Total	90μl	900μl



Facultad de Medicina UNAM Departamento de Bioquímica
Laboratorio de Fisiología e Ingeniería de Proteínas

PROTOCOLO DE CINETICA

SIN ACTIVADOR

Tubo	GlcN6P 100mM (μ l)	H ₂ O (μ l)	Mezcla S/act	Enzima 20nM (μ l)	Incubar a 30°C por 10min. Agregar 2ml de HCl (10N) y 0.5ml de resorcinol. Incubar a 70°C por 10min. Enfriar con hielo y leer a 512nm	[GlcN6P] final mM	Abs 512nm	[fructosa] mM
1	1	99	90	10		0.5		
2	2	98	90	10		1.0		
3	5	95	90	10		2.5		
4	6	94	90	10		3.0		
5	8	92	90	10		4.0		
6	15	85	90	10		7.5		
7	20	80	90	10		10		
8	30	70	90	10		15		

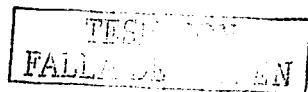
CON ACTIVADOR

Tubo	GlcN6P 100mM (μ l)	H ₂ O (μ l)	Mezcla C/act	Enzima 20nM (μ l)	Incubar a 30°C por 10min. Agregar 2ml de HCl (10N) y 0.5ml de resorcinol. Incubar a 70°C por 10min. Enfriar con hielo y leer a 512nm	[GlcN6P] final mM	Abs 512nm	[fructosa] mM
1	1	99	90	10		0.5		
2	2	98	90	10		1.0		
3	5	95	90	10		2.5		
4	6	94	90	10		3.0		
5	8	92	90	10		4.0		
6	15	85	90	10		7.5		
7	20	80	90	10		10		
8	30	70	90	10		15		

9.2 Tabla de propiedades de solventes orgánicos

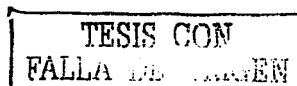
Solvente	Fórmula	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Densidad (g/mL)	Solubilidad en agua (g/100g)	Polaridad relativa
Acido acético	C ₂ H ₄ O ₂	118	16.6	1.049	M ⁷	0.648
Acetona	C ₃ H ₆ O	56.2	-94.3	0.786	M	0.355
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	81.6	-46	0.786	M	0.460
Benceno	C ₆ H ₆	80.1	5.5	0.879	0.18	0.111
1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	117.6	-89.5	0.81	7.7	0.602
2-butanona	C ₄ H ₈ O	79.6	-86.3	0.805	25.6	0.327
Alcohol <i>t</i> -butílico	C ₄ H ₁₀ O	82.2	25.5	0.786	M	0.389
Tetracloruro de carbono	CCl ₄	76.7	-22.4	1.594	0.05	0.052
Cloroformo	CHCl ₃	61.2	-63.5	1.498	0.8	0.259
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	80.7	6.6	0.779	<0.1	0.006
dieleno glicol	C ₄ H ₁₀ O ₂	245	-10	1.118	M	0.713
Diglyme	C ₄ H ₁₀ O ₂	162	-64	0.945	M	0.244
dimetoxi-etano	C ₄ H ₁₀ O ₂	85	-58	0.868	M	0.231
dimetilformamida (DMF)	C ₃ H ₇ NO	153	-61	0.944	M	0.404
Dimetil sulfoxide (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	189	18.4	1.092	M	0.444
Dioxano	C₄H₈O₂	101.1	11.8	1.033	M	0.164
Etanol	C ₂ H ₆ O	78.5	-114.1	0.789	M	0.654
Éter	C ₄ H ₁₀ O	34.6	-116.3	0.713	7.5	0.117
Acetato de etil	C ₄ H ₈ O ₂	77	-83.6	0.894	8.7	0.228
Etilenglicol	C ₂ H ₆ O ₂	197	-13	1.115	M	0.790
Glicerina	C ₃ H ₈ O ₃	290	17.8	1.261	M	0.812
Heptano	C ₇ H ₁₆	98	-90.6	0.684	0.01	0.012
Hexano	C ₆ H ₁₄	69	-95	0.655	0.014	0.009
Metanol	CH ₄ O	64.6	-98	0.791	M	0.762
metil <i>t</i> -butil eter (MTBE)	C ₅ H ₁₂ O	55.2	-109	0.741	4.8	0.148
Cloruro de metileno	CH ₂ Cl ₂	39.8	-96.7	1.326	1.32	0.309
Pentano	C ₅ H ₁₂	36.1	-129.7	0.626	0.04	0.009
1-propanol	C ₃ H ₈ O	97	-126	0.803	M	0.617
2-propanol	C ₃ H ₈ O	82.4	-88.5	0.785	M	0.546
Tetrahidrofurano (THF)	C ₄ H ₈ O	66	-108.4	0.886	30	0.207
Tolueno	C ₇ H ₈	110.6	-93	0.867	0.05	0.099
Agua	H₂O	100.00	0.00	0.998	M	1.000
Agua, deuterio (D ₂ O)	D ₂ O	101.3	4	1.107	M	0.999
<i>p</i> -xileno	C ₈ H ₁₀	138.3	13.3	0.861	I	0.074

⁷ La solubilidad es completamente micible en agua.

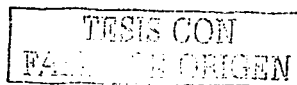


10. Bibliografía

- A. E. Radkowsky and E. M. Kosower. (1986) **Bromobimane Probes for Thiols**. *J. Am. Chem Soc.* **108**: 4527.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E. y Calcagno, M. L. (1995) **Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121**. *Biochemistry* **34**: 6074-6082.
- Bergström, F., Hägglöf P., Karoli, J., Ny, T., Johansson, L, B-A. (1999) **The use of site directed fluorophore labeling and dono-donor energy migration to investigate solution structure and dynamics in proteins**. *Pro. Natl. Acad. Sci.* **96**: 12477-12481.
- Blow, D.M., Collyer, C.A., Goldberg, J. D. and Smart, O.S. (1992) *Faraday Discuss.* **93**: 67-73.
- Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G. y Suastegui, J. (1984) **Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli***. *Biochim Biophys Acta* **787**: 165-173.
- Edward M. Kosower, Rina Giniger, Annette Radkowsky, David Hebel, and Alan Shusterman. (1986) **Bimanes. 22. Flexible Fluorescent Molecules. Solvent Effects on the Photophysical Properties of syn-Bimanes (1,5-Diazabicyclo[3.3.0]octa-3,6-diene-2,8-diones)**. *Journal of Physical Chemistry*, **90**: 5552-5557.
- Gabriela M. Montero-Moran, Samuel Lara-González, Laura I. Álvarez-Añorve, Jacqueline A. Plumbridge, and Mario L. Calcagno. (2001) **On the Multiple Functional Roles of the Active Site Histidine in Catalysis and Allosteric Regulation of *Escherichia coli* Glucosamine 6-Phosphate Deaminase**. *Biochemistry* **40**: 10187-10196.
- Goodsell, D. S. Y Olson, A.J. (2000) **Structural Symmetry and protein Funcyion** *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **29**: 105-153.
- Hubell, W.L., Cafiso, D.S. and Altenbach, C. (2000) **Identyfing conformational changes with site-directed spin labeling**. *Nature Structural Biology*, **7**: 735-739.
- Ismael Bustos-Jaimes, Alejandro Sosa-Peinado, Enrique Rudiño-Piñera, Eduardo Horjales and Mario L. Calcagno. (2002) **On the Role of the Conformational Flexibility of the Active-site Lid on the Allosteric Kinetics of Glucosamine-6-phosphate Deaminase**. *J. Mol. Biol.* **319**: 183-189.
- Jan B van Beilen and Zhi Li. (2002) **Enzyme technology: an overview**. *Current Opinion in Biotechnology*. **13**: 1-7.
- Lakowicz , J. R. (1999) **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Publishing Corporation. New York.



- Linda Columbus and Wayne L. Hubbell (2002) **A new spin on protein dynamics.** *TRENDS in Biochemical Sciences*, **27**: 288-295.
- Mansoor, S.E., Mchaourab, H.S. and farrens, D.L. (1999) **Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling. Studies of T4 Lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane.** *Biochemistry*, **39**: 16383-16393.
- Midelfort, C. and Rose, I. A. (1977) **Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase.** *Biochemistry* **16**: 1590-1596.
- Mildeford, C.F., y Rose, I. A. (1977) **Studies on the mechanism of *Escherichia coli* Glucosamine-6-phosphate isomerase.** *Biochemistry*, **16**: 1509-1596.
- Midelfort, C. F., Gupta, R. K. y Rose, I. A. (1976) **Fructose 1,6-bisphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases.** *Biochemistry* **15**: 2178-2185.
- Myriam M. Altamirando, Jacqueline A. Plumbridge, Andrés Hernández-Arana and Mario Calcagno. (1991) **Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **1076**: 266-272.
- Oliva, G., Fontes, M.R.M., Garratt, R.C., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L. y Horjales, E. (1995) **Structure and catalytic mechanism of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. at 2.1 Å resolution.** *Structure*, **3**: 1323-1332.
- Ortiz, J. O., and Bubis, J. (2001) **Effects of differential sulfhydryl group-specific labeling on the rhodopsin and guanine nucleotide binding activities of transducin.** *Arch Biochem. Biophys.* **387**: 233-234.
- Perutz M. F. (1990) **Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins.** Cambridge University Press.
- Samuel Lara-González, Henry B. F. Dixon, Guillermo Mendoza-Hernandez1, Myriam M. Altamirano and Mario L. Calcagno. (2000) **On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6-phosphate Deaminase from *Escherichia coli*.** *J. Mol. Biol* **301**, 219-227.
- Selvin, P.R., (2000). **The Renaissance of Fluorescence Resonance Energy Transfer.** *Nature Structural Biology*, **7**: 730-734.
- Steven E. Mansoor, Hassane S. Mchaourab, and David L. Farrens. (1999) **Determination of Protein Secondary Structure and Solvent Accessibility Using Site-Directed Fluorescence Labeling. Studies of T4 Lysozyme Using the Fluorescent Probe Monobromobimane.** *Biochemistry* **38**: 16383-16393.



- Steven E. Mansoor, Hassane S. Mchaourab, and David L. Farrens. (2002) **Mapping Proximity within Proteins Using Fluorescence Spectroscopy. A Study of T4 Lysozyme Showing That Tryptophan Residues Quench Bimane Fluorescence.** *Biochemistry* 41: 2475-2484.
- Tomasz Heyduk. (2002) **Measuring protein conformational changes by FRET/LRET.** *Current Opinion in Biotechnology* 13: 292-296.
- Yu Chen and Mary D. Backley. (1998) **Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins.** *Biochemistry* 37: 9976-9982.
- V. Ratner, E. Kahana, M. Eichler, and E. Haas. (2002) **A General Strategy for Site-Specific Double Labeling of Globular Proteins for Kinetic FRET Studies.** *Bioconjugate Chem.* 13: 1163-1170.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN